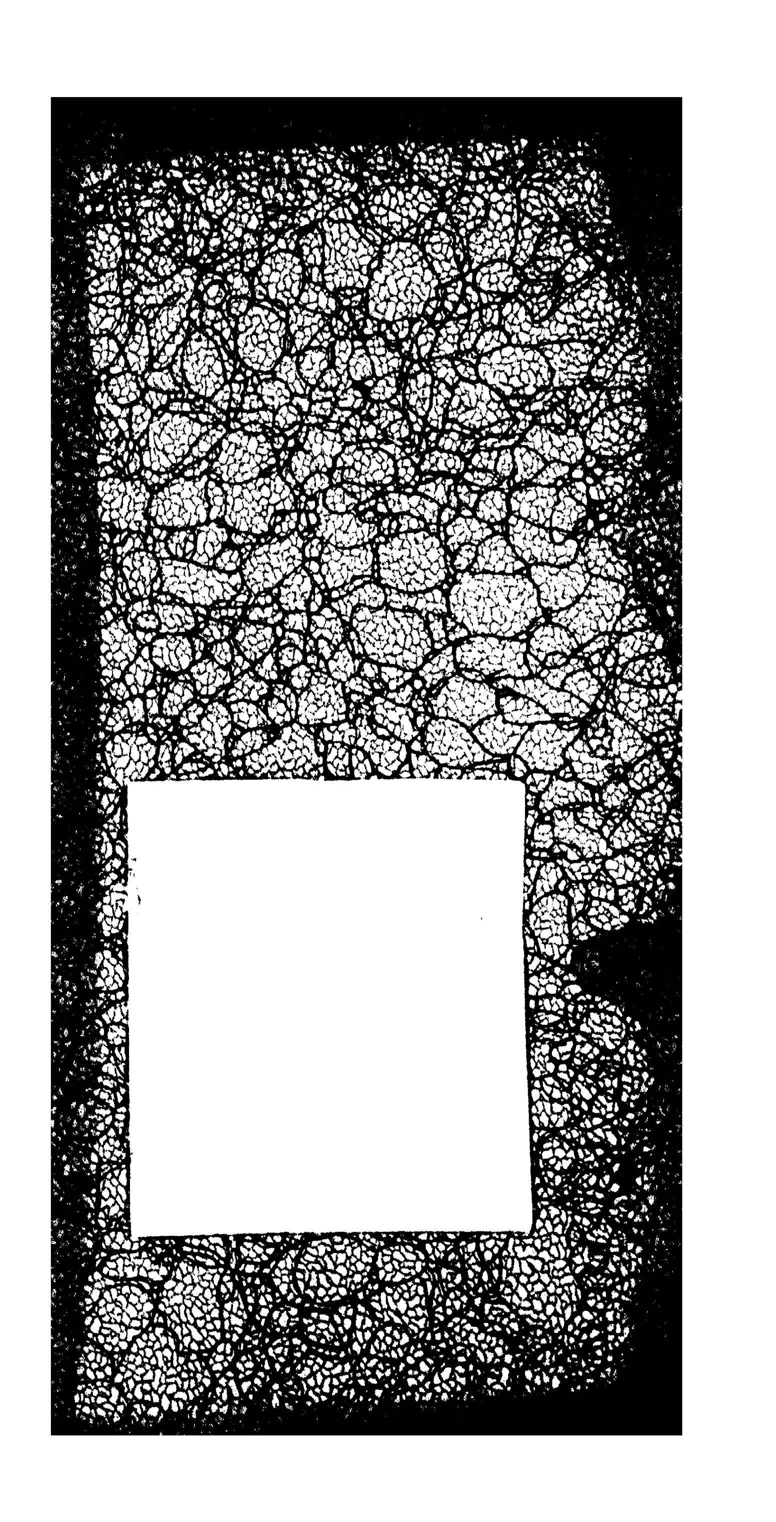
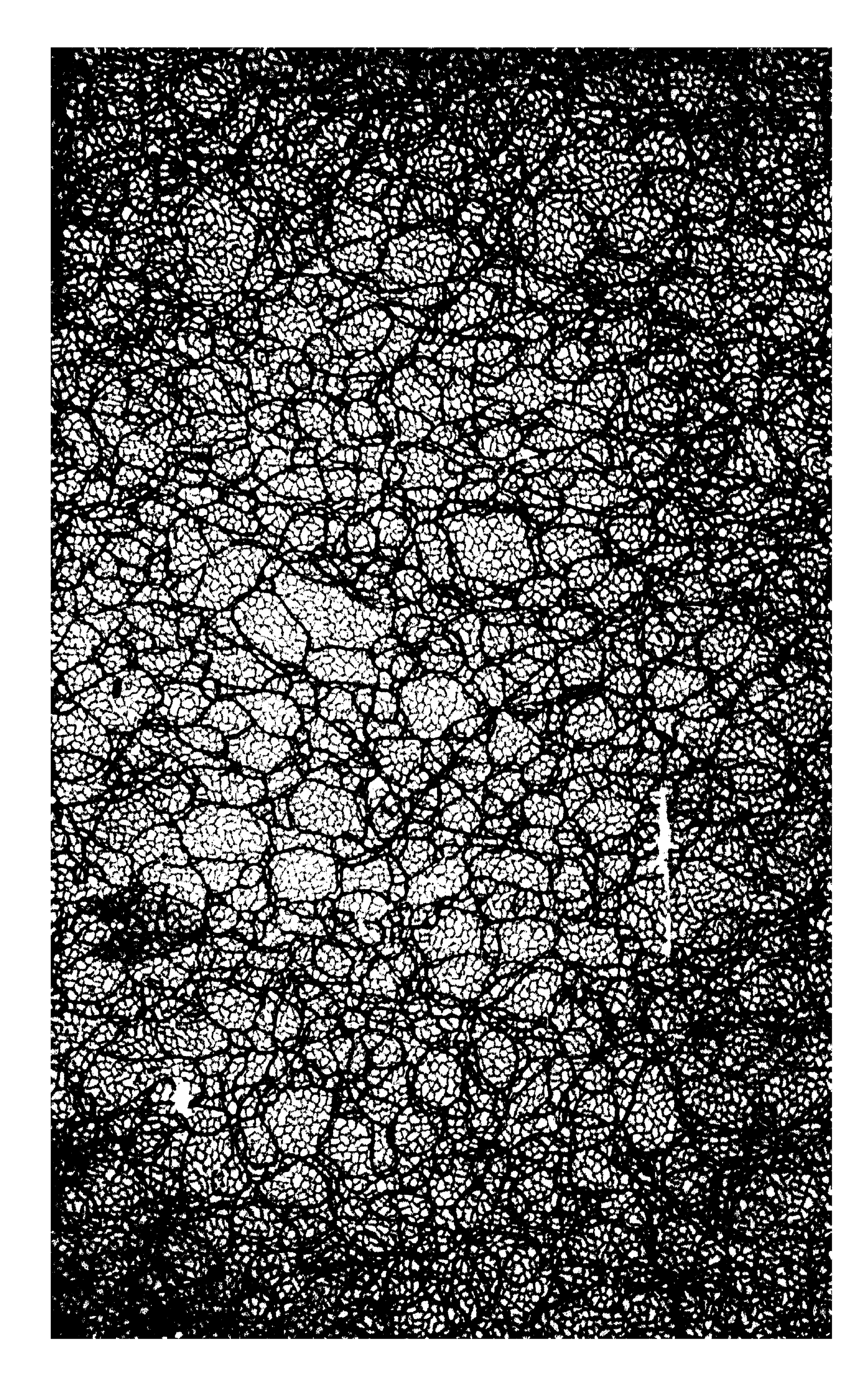




Abschnitt VI.

ÜBER SACCHARASE (INVERTIN).

Annalen der Chemie 425, S. 1 (1921).

45. ZUR KENNTNIS DES INVERTINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und FRITZ RACKE.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayer. Akad. der Wissenschaften in München.)

(Eingelaufen am 15. Oktober 1920.)

Inhalts-Übersicht.

A. Über die Lösung des Invertins aus der Hefe.

I. Probleme bei der Darstellung von Invertinlösungen.

Die Darstellung einer Enzymlösung aus der Hefe ist keine präparative Aufgabe von der Art wie die Isolierung eines frei oder an Säure gebunden vorkommenden Alkaloids oder Farbstoffs aus einem Pflanzenmaterial. Der Zellinhalt des Hefepilzes ist nicht nur ein aus hochmolekularen organischen Körpern zusammengesetztes Gemisch, dessen Komponenten durch richtig gewählte Lösungsmittel, saure oder alkalische Reagenzien, freigemacht und ausgezogen werden können. Das ist wirklich der Fall bei anderen enzymatischen Ausgangsstoffen, die uns die Natur darbietet. In Bestandteilen der Pflanze, Wurzeln, Blättern und Samen, kommen Enzyme gebunden [3] vor, nämlich in Form von Adsorbaten, die sofort die Enzyme freigeben, wenn man die Adsorptionsaffinitäten mit geeigneten Mitteln überwindet. Zum Beispiel liefern die süßen oder bitteren Mandeln beim Ausziehen nach den Vorschriften der Literatur wenig Emulsin; nach einer unveröffentlichten Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI* kann man aber mit verdünnten Alkalien rasch fast die ganze Menge des vorhandenen Emulsins freilegen und in Lösung bringen. Ähnlich verhält es sich mit einem Vorkommen der Peroxydase, die sich in den Keimlingen der Getreidearten reichlich findet. Sie geht fast nicht in wäßrige Lösung; behandelt man aber nach Beobachtungen von R. WILLSTÄTTER und A. POLLINGER** die Keimlinge mit natriumbicarbonathaltigem Wasser, so wird sofort die gesamte Peroxydase frei und geht in den wäßrigen Auszug. Diese Mittel versagen bei dem Pilz. Die Enzyme sind mit Bestandteilen der Hefezellen so fest assoziiert, daß ihr Löslichwerden den Abbau der Eiweißkörper und noch anderer hochmolekularer Stoffe zur Voraussetzung hat.

Die Hefe ist ein Lebewesen von sehr veränderlicher Zusammensetzung. Daher ist der Versuch aussichtsreich, den H. v. EULER[1] mit seinen Mitarbeitern und J. MEISEN...

* *Abh. 77.* ** *Abh. 43.*

[1] H. v. EULER und O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 269 [1919]; **106**, 2.. [1919]; über die älteren Versuche von EULER siehe hier S. 213; O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65 [1920].

HEIMER, ST. GAMBARJAN und L. SEMPER[1] unternahmen, sie durch geeignete Züchtung und Ernährung invertinreicher zu machen. Es ist aber auch möglich, wie im folgenden gezeigt wird, in der abgetöteten Hefe Invertinbildung hervorzurufen, so daß die Auszüge viel mehr, sogar manchmal das Doppelte an Invertin vom angewandten Pilz erhalten.

Das Hauptproblem bei der Darstellung von Enzymlösungen, z. B. von Invertin aus Hefe, stellen die [4] postmortalen enzymatischen Vorgänge dar, welche die Freilegung durch Löslichwerden des Invertins und zugleich unvermeidlich das Löslichwerden und in Lösung gehen der Begleitstoffe zur Folge haben. Das Invertin ist, wie sich im folgenden ergeben wird, in der Hefe entweder örtlich geschützt oder es ist durch chemische Bindung oder durch Adsorptionsaffinität an unlösliche Körper verankert, vielleicht der Kohlehydrat- oder der Proteinklasse. Es ist aber nicht wahrscheinlich, daß die Freilegung des Invertins in unlösbarem Zusammenhang steht mit dem allgemeinen enzymatischen Protoplasmaabbau bei der Selbstauflösung der Hefe. Diese postmortalen Vorgänge können in der mannigfaltigsten Weise geleitet und beeinflußt werden. Die Aufgabe ist, sie so zu leiten, daß die größte Menge von Invertin in Lösung gebracht wird, zusammen mit solchen Begleitstoffen, welche die Reinigung und Isolierung des Enzyms am wenigsten stören.

Die totale Autolyse der unverdünnten Hefe, eine der seit C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON[2]) meist angewandten Methoden zur Enzymgewinnung, bringt einen zu großen Ballast von mehr oder weniger abgebauten Eiweißkörpern und Kohlehydraten in die Flüssigkeit. Wird die Hefe, mit Wasser verdünnt, bei Gegenwart eines antiseptischen Mittels sich selbst überlassen, so wandert unter diesen Bedingungen partieller Autolyse das Invertin rascher in wäßrige Lösung, so daß die Auflösung der Begleitstoffe herabgemindert wird. Noch mehr werden die endotryptischen Vorgänge hintangehalten durch Ausziehen mit ammoniakalischem Wasser; die Exosmose des Invertins ist noch mehr abgekürzt, seine Begleiter sind in diesem Fall wenig abgebaute Eiweißkörper der Hefe; gerade dieser Umstand hat aber die Invertinlösungen für einen in dieser Arbeit angewandten Gang der Reinigung zunächst minder geeignet gemacht. Die von der [5] Hefe abgetrennten Enzymlösungen stellen keine fertigen Produkte dar, sondern in ihnen nehmen enzymatische Reaktionen ihren Fortgang; das Altern scheint die Invertinlösungen zu verbessern, indem die höheren Proteine in niedrigere umgewandelt werden können.

Auch die Lehre von S. P. L. SÖRENSEN[3]) von der Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen ist für diese präparative Arbeit von Bedeutung. Es ist zu berücksichtigen, daß die Hefeenzyme nicht einer für sie unerträglichen Reaktion des Mediums ausgesetzt werden. Zum Beispiel läßt sich die Hefemaltase, die bisher aus Frischhefe nicht extrahiert werden konnte, vollständig in Lösung

[1]) Biochem. Ztschr. 54, 108 u. 122 [1913]; J. MEISENHEIMER und L. SEMPER, Biochem. Ztschr. 67, 364 [1914].

[2]) Journ. chem. soc. 57, 834 [1890].

[3]) Biochem. Zeitschr. 21, 131 [1909].

überführen[1], wenn man die entstandene Säure neutralisiert, die beim Abtöten de: Hefe durch Toluol langsam, durch Chloroform rasch als Produkt enzymatischer Vor-gänge gebildet wird. Die Säure ist am gefährlichsten, weil am konzentriertesten, am Ort ihrer Entstehung, in der Hefezelle selbst.

Ferner hat die Wahl des Antisepticums auf die Enzymisolierung großen Einfluß. Bei Gegenwart von Toluol wird die Invertinausbeute hoch, bei Gegenwart von Essig-ester sehr gering. Dieses abtötende Mittel schädigt zwar gar nicht das Invertin, aber es unterdrückt die enzymatischen Abbauvorgänge, durch die das Invertin löslich wird. Auch der Kohlehydratabbau ist von den antiseptischen Mitteln abhängig die Menge des in Lösung gehenden Hefegummis ist groß bei Gegenwart von Toluol gering mit Chloroform.

Die Lösungen des Invertins lassen sich nicht nach ihrem Gehalt an Invertin allein beurteilen, wenn man darauf ausgeht, das Enzym weiter zu reinigen. Die in-vertinreichsten Auszüge, die mit ammoniakalischem [6] Wasser bei Gegenwart von Toluol entstehen, sind nicht gut dafür anwendbar infolge der starken Adsorptions-fähigkeiten der nach der üblichen Ausfällung von Eiweiß noch vorhandenen zu wenig abgebauten Begleitstoffe. Die Züchtung der Hefe könnte die präparative Arbeit außer durch Vermehrung des Invertins auch durch Verminderung des Ballastes von störenden Begleitstoffen, also durch Verbesserung der Enzymlösungen unterstützen.

Die quantitative Analyse der Enzymlösungen reicht zur Beurteilung nicht aus aber sie ist die leitende Methode. Die präparative Arbeit vom Pilz bis zum Enzym in Substanz wird durch die quantitative Analyse geleitet, und zwar in zwei verschie-denen Beziehungen: hinsichtlich der Ausbeute im Verhältnis zum Ausgangsmaterial (Menge-Zeit-Quotient des Invertins) und hinsichtlich des Reinheitsgrades (Zeitwert des Invertins) in den Hefeauszügen und Invertinpräparaten.

II. Bestimmung von Invertin in den Auszügen; Maße für Konzentration und Ausbeute.

Die Bestimmung beruht auf den Arbeiten von C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON[1]), C. S. HUDSON[2]), S. P. L. SÖRENSEN[3]), L. MICHAELIS[4]) und besonders H. v. EULER[5]). Die Menge des Invertins wird durch die Reaktionsgeschwindigkeit der Rohrzucker-spaltung bei p_H-Optimum gemessen, die in weiten Grenzen der [7] Enzymmenge proportional ist[6]]. Die Geschwindigkeit wird ebenso wie durch die Konstante de:

[1] R. WILLSTÄTTER, G. OPPENHEIMER und W. STEIBELT, Ztschr. f. physiol. Chem. 110 232 [1920]; R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Ztschr. f. physiol. Chem. 111, 157 [1920].

[1]) Journ. chem. soc. 57, 834 [1890].

[2]) Journ. Am. chem. soc. 30, 1160 u. 1564 [1908].

[3]) Biochem. Ztschr. 21, 131, und zwar S. 256 [1909].

[4]) L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN, Biochem. Ztschr. 35, 386 [1911]; L. MICHAELIS und M. M. MENTEN, Biochem. Ztschr. 49, 333 [1913]; L. MICHAELIS, Biochem. Ztschr. 60, 91 [1914].

[5]) H. v. EULER, E. LINDBERG und K. MELANDER, Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 152 [1910]; H. v. EULER und S. KULLBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 335 [1911]; H. v. EULER und O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 269 [1919].

[6]] C. S. HUDSON, Journ. Am. chem. soc. 30, 1160 [1908]; H. v. EULER und O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 269, und zwar S. 275 [1919].

monomolekularen Reaktion auch ausgedrückt durch die Zeit bis zu einem bestimmten Grad der Spaltung. Während H. v. EULER und O. SVANBERG[2] in ihren letzten Arbeiten andere Maße einführten (Aktivitätszahl, Inversionsfähigkeit), ziehen wir es vor, in dieser Untersuchung den anschaulichen und am genauesten bestimmbaren Ausdruck, die Zeit bis zur o-Drehung, anzuwenden. Da unter geeigneten Bedingungen der Invertinwirkung k annähernd konstant gefunden wird, so kann der Zeitwert[3] aus der logarithmischen Kurve mit wenigen Messungen oder einer einzigen entnommen werden, mindestens für den Bereich von 30 bis 80% Spaltung.

Der Invertingehalt wird daher gemäß der Eulerschen Definition[4] durch die Zeit t in Minuten gemessen, die 0,05 g getrocknete Hefe oder der dieser Menge entsprechende Auszug oder 0,05 g Präparat brauchen, um bei 15,5° 4 g Rohrzucker in 25 ccm Lösung, die 1% NaH_2PO_4 enthält, zu 75,75% zu spalten, nämlich so weit, daß nach Aufhebung der Multirotation die Drehung für D = 0° ist. Der Minuten- oder Zeitwert des Invertins ist, da er sich auf gleiche Trockengewichte (0,05 g) bezieht, das Maß seiner Konzentration (z. B. in der Hefe) und seines Reinheitsgrades (z. B. im fertigen Präparate). Für die Extrakte werden die Zeitwerte auf die [8] verarbeiteten Hefen (Invertin aus 0,05 g wasserfreier Hefe) bezogen, so daß sie ein Maß der Ausbeute darstellen („Zeitwert bezogen auf Hefe"; $\frac{\text{Zeitwert der Hefe}}{\text{Zeitw. d. Extr. b. a. H.}} \cdot 100 = \text{Ausbeute}$). Man kann auch die Zeitwerte der Invertinlösungen auf ihre Trockengewichte beziehen (auf 0,05 g Trockenrückstand), um sie als Maß der Invertinkonzentration dienen zu lassen („Zeitwert bezogen auf Trockengewicht"). Um auch die Enzymmengen (und bei den Präparaten die Ausbeute) zu bestimmen und zu vergleichen, werden nach dem Vorbild des Menge-Wert-Produktes[1]) der Peroxydase (des Peroxydasewertes[2])), mit derselben Absicht wie O. SVANBERG[3]) den Gesamtsaccharasegehalt durch die monomolekulare Reaktionskonstante multipliziert mit dem Totalvolumen der Lösung definiert, zwei Ausdrücke eingeführt: Menge-Zeit-Produkt und Menge-Zeit-Quotient. Ersteres ist die Zeit, die zur Inversion des Rohrzuckers bis auf 75,75% erforderlich wäre, wenn die gesamte Enzymmenge unter den angegebenen Bedingungen auf 4 g Rohrzucker in 25 ccm einwirken würde. Der Menge-Zeit-Quotient (M.Z.Q.) ist der reziproke Wert, ist Enzymmenge in einer konstanten, willkürlich gewählten Gewichtseinheit ausgedrückt, nämlich der Quotient des in Form von Hefe, Extrakt oder Präparat gewogenen (bzw. abgemessenen) Materials und seiner durch den Minutenwert gemessenen Wirkungszeit. Dieser Wert, der Enzymmenge

[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 269, und zwar S. 273 [1919]. O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 65, und zwar S. 83 [1920].

[3] Zwischen diesem Zeitwert und der bei derselben Temperatur bestimmten Konstante besteht die Beziehung $k = \frac{0,6153}{t}$ (vgl. H. v. EULER und S. KULLBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 15 [1911]).

[4] Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 160 [1910]; 73, 336 [1911]; 107, 273 [1919].

[1]) R. WILLSTÄTTER und A. STOLL, diese Annalen 416, 21, und zwar S. 28 [1918].

[2]) R. WILLSTÄTTER, diese Annalen 422, 47, und zwar S. 49 [1920/21].

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 65, und zwar S. 83 [1920].

direkt proportional, ist additiv; den Summen verschiedener Invertinmengen entsprechen die Summen ihrer Menge-Zeit-Quotienten.

Ausführung. Die pufferhaltige Zuckerlösung bringen wir mit etwa so viel Invertinlösung auf 100 ccm, daß die Hydrolyse zur Nulldrehung 60 bis 180 Minuten erfordert. [9] Zwischen 50 und 75% Spaltung wird die Reaktion durch Eintragen von 25 ccm in ein mit 5 ccm 2n-Soda beschicktes Reagierglas sistiert, das mindestens 15 Minuten im Thermostaten von 20° bleibt.

Die Berechnung geschieht nach O'SULLIVAN und TOMPSON, nur mit dem Unterschied, daß der Nullwert bei 75,75% Spaltung liegt gegenüber 74,1% der englischen Forscher, da wir λ_D bestimmen gegenüber λ_j bei O'SULLIVAN und TOMPSON, die mit dem „jaune moyen" von BIOT[1] arbeiteten. Die mit den angegebenen Proben ermittelten Nulldrehungszeiten und die daraus berechneten Minutenwerte sind im Intervall von 50 bis 80% Spaltung mindestens auf ± 2% genau (möglicher Fehler) bestimmt; den Hauptfehler, dem gegenüber die Versuchsfehler verschwinden, bedingen die Abweichungen der Reaktionskurve von der logarithmischen.

Ein Beispiel der Verarbeitung von Hefe soll die Anwendung und die Bedeutung der Maße anschaulich machen. In der Tab. 1 ergibt sich aus den Minutenwerten 3,… und 0,86 für das Präparat eine gegen vierhundertfache Invertinkonzentration im Vergleich zur Hefe und aus dem Rückgang des M.Z.Q. von 100,8 auf 9,18 eine Invertinausbeute von 8,37% der Theorie.

[10] Tabelle 1. Beispiel für die Maße der Konzentration und Ausbeute.

Enzymmaterial	Menge	Nulldrehungszeit (Min.)	Zeitwert b. d. Hefe	Zeitwert b. d. Trockengew.	Menge-Zeit-Produkt	Menge-Zeit-Quotient	Ausbeute (P.)
Brauereihefe, 20prozentig	9,0 kg	104,5 f. 0,5 g Hefe	320	320	0,00612[1]	100,8	10[illegible]
Der gebildete Hefeauszug, filtriert gedacht		190 f. 1:25 ccm	340				[illegible]
Der im Versuch gewonnene Hefeauszug	20,3 L.	190 f. 1:25 ccm			0,0117	88,5	[illegible]
Invertinlösung, gereinigt mit Tonerde	10,10 L.	108 f. 2,5 ccm			0,0418	24,3	[illegible]
Invertinlösung, weiter gereinigt mit Kaolin	1100 ccm	237 f. 0,5 ccm			0,108	9,26	8,[illegible]
Invertinpräparat	0,383 g	17,2 f. 0,0025 g		0,86	0,109	9,18	8,[illegible]

[1] Beispiel für die Berechnung von M.Z.P.: $\frac{104{,}5 \cdot 0{,}5}{9000}$.

III. Bestimmung des Invertins in der Hefe.

Auf der Bestimmung des Invertins der frischen Hefe beruhen die Ausbeuteangaben bei der Darstellung von Invertinlösungen und Präparaten.

Nach JAMES O'SULLIVAN[2] hat H. v. EULER[3] gemeinsam mit seinen Schülern die Kinetik des Invertins [11] in der frischen Hefe gründlich untersucht und sowohl

[1] Siehe H. T. BROWN, G. H. MORRIS und J. H. MILLAR, Journ. chem. soc. 71, 72, und zwar S. 86 [1897].

[2] Journ. chem. soc. 61, 593, 926 [1892].

[3] H. v. EULER und S. KULLBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 14, und zwar S. 20 [1911]; 73, 85, und zwar S. 93 [1911]; H. v. EULER und O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. 10…

im monomolekularen Verlauf der Reaktion wie in der Proportionalität von Wirkung und Menge weitgehende Übereinstimmung zwischen lebender Hefe und Invertinlösungen festgestellt. Es bedingte keinen erheblichen Unterschied, ob mit oder ohne abtötende Mittel wie Toluol oder Chloroform gearbeitet wurde. Im Versuch ohne Antisepticum macht sich die Gärung in der kurzen Zeit und bei der niederen Temperatur wenig bemerkbar. Und bei der Abtötung der Hefe ist es ohne Einfluß, daß durch Toluol eine allmähliche, durch Chloroform eine rasche Säureproduktion in der Hefezelle hervorgerufen wird. Während eben dieser Umstand die Bestimmung der Maltase[1] in der Hefe immer gehindert hat, wird die Invertinreaktion, für die ein Bereich von p_H 3,8 bis 5,0 günstig ist, durch die auftretende Säure nicht gestört. Merkwürdigerweise macht sich keine Hinderung der Diffusion der gelösten Stoffe durch die Zellwand bemerkbar; die Biose und auch der zur Einstellung der optimalen Wasserstoffzahl erforderliche Puffer, der in diesem Falle freilich eine viel weniger wichtige Aufgabe wie bei der Maltase oder überhaupt keinen Einfluß hat, gelangt so rasch an den Reaktionsort in der Zelle, daß das Invertin in der Hefe ebenso wirkt wie in wäßriger Lösung. Wird im Gange der Bestimmung die Zuckerlösung mit der Zentrifuge von der Hefe getrennt, so geht die Inversion in ihr nicht weiter; also verläßt kein Anteil des Invertins die Hefezelle während der Reaktion, wie auch schon J. O'SULLIVAN[2], sowie H. v. EULER und S. KULLBERG[3] gefunden haben.

Es ist indessen noch nicht bewiesen, daß wirklich die beobachtete Invertinwirkung die maximale ist, daß die gesamte Invertinmenge in der frischen Hefe zur [12] Wirkung gelangt. H. v. EULER[4]) begründet die Zuverlässigkeit der Invertinbestimmungen in Hefe folgendermaßen: „Mit der gleichen Menge ein und derselben Hefe wird nämlich unter übereinstimmenden äußeren Bedingungen (Temperatur, Acidität usw.) die gleiche Invertasewirkung erzielt, unabhängig davon, ob die Zellen durch Trocknen entwässert wurden oder durch Toluol bzw. Chloroform an Zuwachs und Gärtätigkeit gehemmt wurden, oder ob die Hefe frisch zur Anwendung kam." Da es uns aber gelingt, bei der Exosmose des Invertins aus der Hefe unter gewissen Bedingungen anwachsende Invertinwirkung zu beobachten (siehe Abschnitt VI), so durften wir die Neubildung des Enzyms in der abgetöteten Hefe nicht für sicher halten, ohne die Bestimmung darauf nachzuprüfen, ob sie den maximalen Wert ergibt.

Die Bestimmung führen wir stets unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition aus, da Abänderungen, wie sie in den Eulerschen Untersuchungen häufig vorkommen, den Vergleich erschweren. 2,00 g frische Hefe, deren Trockengewicht bestimmt wird, suspendieren wir in Wasser und bringen unter Zusatz von Puffer und gewöhnlich von etwas Toluol mit 16 g Zucker auf 100 ccm. Zur Sistierung der Hydrolyse (in 25 ccm

187, und zwar S. 194 u. 211 [1919]; **106**, 201, und zwar S. 214 [1919]; H. v. EULER und R. BLIX, Zeitschr. f. physiol. Chem. **105**, 83, und zwar S. 88 u. 106 [1919].

[1] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Zeitschr. f. physiol. Chem. **111**, 157 [1920].

[2] Journ. chem. soc. **61**, 593 [1892].

[3] Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 20 [1910].

[4]) H. v. EULER und R. BLIX, Zeitschr. f. physiol. Chem. **105**, 88 [1919].

mit 5 ccm Soda) zeigt sich, wie J. MEISENHEIMER, ST. GAMBARJAN und L. SEMPER beobachtet [3] haben, die Soda bei der Hefe nicht ausreichend; man muß möglichst rasch von ihr abfiltrieren.

Die als Ausgangsmaterial für unsere Präparate angewandte Hefe der Löwenbrauerei in München war infolge der ungünstigen Versorgung der bayerischen Bierbrauereien im Enzymgehalt schwankend und gewiß nicht besonders günstig. Die Invertingehalte blieben zurück hinter den von H. v. EULER und S. KULLBERG [2] in mittelguten schwedischen Brauereihefen bestimmten (Minutenwert 140). In den umfassenden Untersuchungen [13] von H. v. EULER und O. SVANBERG [1]) über „Saccharasegehalt und Saccharasebildung in der Hefe" wurde für zwei im Stockholmer Laboratorium seit 1911 bzw. 1917 bearbeitete Hefen bemerkenswerte Konstanz der Saccharasewirkung bei gleicher Vorbehandlung festgestellt. Indessen arbeiteten EULER und SVANBERG [2]) in präparativem Maßstab auch mit Hefen von viel ungünstigerem Invertingehalt; bei ihren Darstellungen von Invertin nach Anreicherung des Enzyms in der Hefe war der Minutenwert der Ausgangshefe 400 und wurde durch ihre Vorbehandlung mit Zucker und Ammonphosphat auf 90 gesteigert.

Hefe der Löwenbrauerei in München.

November 1918	270								
Dezember 1918	300	340							
Mai 1919	295,	328,	318	333					
Juni 1919	305,	327,	350	437					
Juli 1919	400,	300,	380,	310					
August 1919	350,	330	328						
Oktober 1919	340,	280	328,	280,	312,	236,	306,	380,	274

Sechswöchentliche Gärpause in den Brauereien.

Dezember 1919	450,	603
Januar 1920	245,	235
Februar 1920	230	

Um zu prüfen, ob die Invertinwirkung der Hefe beim Zerstören der Zellstruktur ansteigt, zerrieben wir die Hefe aufs gründlichste mit Seesand. In derselben Absicht hat schon J. O'SULLIVAN [3]) eine Reihe von Versuchen angestellt. Er zerrieb ohne Sand; nach Verreiben der Hefe mit Wasser, wobei viele Zellen zerrissen wurden, stimmte die Invertinwirkung mit der von unversehrter Hefe überein. Durch Verreiben frischer Hefe ohne Zusatz von Wasser wurde die Invertinwirkung wesentlich geschwächt. Die Erklärung dafür liegt zum [14] Teil in der Austrocknung der Hefe beim Zerreiben unter diesen Umständen; trockne Hefe entfaltet unter den Bedingungen der Invertinbestimmung in Frischhefe nicht die volle enzymatische Wirkung. In unseren Versuchen ließ das mikroskopische Bild keine unversehrte Hefezelle mehr erkennen.

[2] Biochem. Zeitschr. **54**, 122, und zwar S. 142 [1913].
[3] Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 14, und zwar S. 29 [1910].
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **106**, 201 [1919].
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 269 [1919]; O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65 [1920].
[3]) Journ. chem. soc. **61**, 926, 932 [1892].

die Invertinwirkung war durch das Zerreiben nicht beeinflußt (Tab. 2). Das nämliche zeigt sich beim Behandeln mit flüssiger Luft, wobei die Zellwände nicht zerrissen, die Hefe aber verflüssigt wurde.

5,00 g Hefe wurden mit 10 g Seesand in einer matten Porzellanreibschale 30 bis 45 Minuten unter Zusatz von etwas Toluol sehr kräftig zerrieben. Das Gemisch wurde dann in einen mit 125 ccm 32 proz. Zuckerlösung beschickten 250 ccm Meßkolben übergespült, genau entsprechend den gewöhnlichen Bestimmungsbedingungen. Dabei war das Volumen des Seesandes in Rechnung zu setzen, was eine kleine Ungenauigkeit mit sich brachte. Da nach dem Sistieren mit Soda die Filtration auf Schwierigkeiten stieß, wurden unter Einhaltung der Bestimmungsbedingungen 100 ccm mit Talk und spanischer Klarerde geschüttelt und auf einer Nutsche durch eine Talkschicht über Filtrierpapier abgesaugt. So erhielt man sehr rasch klare Lösungen für die Polarisation.

Tabelle 2. Invertinwirkung frischer und zerriebener Hefe.

	Minutenwert der frischen Hefe	Minutenwert der zerriebenen Hefe
1. Versuch (Anh. Nr. 1)	[illegible]	352
2. Versuch (Anh. Nr. 2)		
a) sofort	310	314
b) nach 2 Tagen bestimmt		308
3. Versuch (Anh. Nr. 3)	312	310
4. Versuch (Anh. Nr. 4)		
a) sofort	340	320
b) nach 2 Tagen bestimmt		355

[15] Getrocknete Hefe. H. v. Euler und S. Kullberg[1] hatten früher bei der vorsichtigen Entwässerung der Hefe einen Rückgang der Invertinwirkung auf etwa die Hälfte beobachtet. Später äußerte sich Euler[2] dahin, daß durch die Trocknung der Enzymgehalt nicht beeinflußt werde.

Es fehlte bisher ein Verfahren, das Invertin in getrockneter Hefe zu bestimmen, was für die gewöhnlichen Trockenhefen[3] schwieriger ist als bei Frischhefe. Hefe, die drei Tage an der Luft getrocknet worden, gab beim Extrahieren unter Zusatz von Toluol 83% des Invertins an die wäßrige Lösung ab (Anhang Nr. 26); in gemahlenem Zustande ergab sie unter den Bedingungen der Frischhefeanalyse nur ²/₃ der zu erwartenden Invertinwirkung (Anhang Nr. 5).

Die Bestimmung gelang annähernd durch gründlichstes Verreiben mit Seesand; für 1 g Hefe wurden 10 g Seesand angewandt, ½ bis 1 Stunde reichte nicht (vgl. Tab. 3), die Werte stiegen bis zu etwa 2stündigem Verreiben an. Auch dabei wurden die theoretischen Werte nicht mit Sicherheit ganz erreicht. Bei den am vorsichtigsten getrockneten Hefen gibt es gewiß Differenzen (Versuch 1 und 2 der Tab. 3), die kaum der Methode zur Last zu legen sind.

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 85, und zwar S. 95 [1911].

[2] H. v. Euler und P. Lindner, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung. Leipzig 1915, S. 87; H. v. Euler und R. Blix, Zeitschr. f. physiol. Chem. 105, 83, und zwar S. 107 [1919].

[3] Das Verkleben der Hefezellen wird am besten bei der Krause-Trocknung vermieden; Proben von derartig getrockneten Hefen verdankten wir der Freundlichkeit des Herrn Prof. Dr. Oppenheimer.

Tabelle 3. Invertinbestimmung in getrockneter Hefe.

	Trocknung	Minutenwert der frischen Hefe	Bestimmung mit getrockneter Hefe, ¼ Std. mit Sand zerrieben		Bestimmung mit getrockneter Hefe, lange zerrieben		
			Minutenwert	Proz.		Minutenwert	Pr.
1. Versuch (Anh. Nr. 6)	im Luftstrom von 20	288	173	60	1½ Stdn. zerr.	342	[illegible]
2. Versuch (Anh. Nr. 7)	mit absol. Alkohol, mit Äther gewaschen	236	200	84	2½ Stdn. zerr.	278	[illegible]
3. Versuch (Anh. Nr. 8)	lufttrocken	360	300	83	2 Stdn. zerr.	308	[illegible]
4. Versuch (Anh. Nr. 9)	im Luftstrom von 55	230	178	77	2½ Stdn. zerr.	250	[illegible]

Es darf aber gefolgert werden, daß die Hefe bei verschiedenartigen Trocknungen keine Änderung des Invertingehaltes und auch keine Schädigung der enzymatischen Einrichtung erleidet, die beim Extrahieren [16] die Freilegung und das Löslichwerden des Invertins herbeiführt (Abschnitt VI). Trocknung bei 100° wird entgegen den Literaturangaben[1] nicht vertragen (vgl. Abschnitt IV).

IV. Kritik der Methoden zur Isolierung aus der Hefe.

1. Das Wesen des Lösungsvorganges.

Die Methoden zur Darstellung von Invertinlösungen aus Hefe unterscheiden sich wesentlich darin, ob der Zellinhalt ohne enzymatischen Abbauvorgang von den Zellwänden, von den festen und unlöslichen Bestandteilen der Zelle abgetrennt oder ob er durch enzymatische Reaktionen chemisch verändert wird, ehe man ihn von den Hefeüberresten entfernt.

[17] Zur Isolierung des Invertins ohne enzymatischen Abbau wird die Hefe entweder zerrieben, mit Wasser angeschüttelt und filtriert (L. MICHAELIS) oder zerrieben und abgepreßt (J. MEISENHEIMER). Diese Verfahren zielen darauf hin, durch Zerstörung der Zellstruktur das Invertin, das die lebende Hefe nicht an Wasser abgibt, in Lösung überzuführen. Die Ergebnisse sind stets unbefriedigend, weil sich das Invertin in solchem geschützten Zustande oder derart mit hochmolekularen organischen Verbindungen vergesellschaftet vorfindet, daß es nicht wasserlöslich ist. Die Methode läßt sich nur dadurch brauchbar gestalten, daß man mit viel größerer Versuchsdauer, z. B. durch lang fortgesetztes Verreiben, wobei die große Konzentration des Zellinhaltes und die gelinde Erwärmung durch das Reiben den enzymatischen Prozeß beschleunigt, das Wesentliche der Methode aufgibt und sie der Methode, Invertinlösungen durch enzymatischen Abbau darzustellen, nähert.

Die Methode, durch enzymatische Abbauvorgänge das Invertin frei und löslich zu machen, läßt sich so gestalten, daß die frische Hefe unverdünnt der langdauernden

[1] Nach E. BUCHNER (Ber. d. d. chem. Ges. 30, 1110, 1113 [1897]) wird Invertin „der 1 Stunde auf 145° erhitzten Hefe noch in wirksamem Zustand entzogen"; das gilt gewiß nur für einen Bruchteil.

Autolyse überlassen wird (C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON), oder daß sie dabei unter mäßiger Verdünnung mit Wasser der Wirkung eines antiseptischen und abtötenden Mittels unterworfen wird (C. S. HUDSON, rapid autolysis). Nebenumstände, welche die Freilegung des Enzyms verbessern können, sind dabei einerseits die Trocknung, andrerseits die Verflüssigung der Hefe. Außerdem beobachten wir oft als eine Nebenerscheinung des Lösungsvorganges eine Zunahme an Invertinwirkung in der abgetöteten Hefe, somit wahrscheinlich Neubildung des Invertins aus einem Zymogen.

Die Hefeverflüssigung durch abtötende Mittel bedeutet und bewirkt an sich keine Abgabe des Enzyms an Wasser. Und je nach dem dabei angewandten Zellgift werden die enzymatischen Vorgänge verschieden [18] geleitet, so daß nach unserer Auffassung der chemische Apparat der Invertinfreilegung entweder geschont (Toluol) oder geschädigt wird (Essigester); daher ist nur im ersteren Falle die durch Hefeverflüssigung beschleunigte Autolyse für die Invertingewinnung brauchbar. Es zeigt sich, daß im allgemeinen enzymatischen Protoplasmaabbau ein bestimmter, einzeln zu beeinflussender Vorgang enthalten ist, der die Freilegung des Invertins bewirkt.

Somit ist der langsame Übergang des Invertins in Lösung auf seine Lostrennung aus einer besonderen Verankerung entweder durch chemische Bindung oder durch Adsorptionsaffinität oder wahrscheinlicher aus einer besonders geschützten Lage zurückgeführt. Diese Erklärung dürfte auch an die Stelle der Schlußfolgerung zu setzen sein, die vor kurzem O. SVANBERG[1] aus seinen Versuchen über den Lösungsvorgang des Invertins bei der Autolyse von Hefe gezogen hat: „Dem relativ langsamen Übergang des Enzyms aus dem Hefebrei in den Saft entspricht dessen großes Molekulargewicht und langsame Diffusion."

Manches scheint dafür zu sprechen, daß die Bindung des Invertins in der Hefe wie eine chemische ist. Denn an Rohrzuckerlösung wird von der Hefe kein Invertin abgegeben, während wir das Tonerdeadsorbat des Invertins durch Rohrzucker leicht quantitativ zerlegen können (Kap. B, Abschn. III, 3).

Die Vorbereitung der Hefe für die Extraktion durch Trocknung ist wertlos, insoweit sie durch Koagulieren der Eiweißstoffe das Lösen des Invertins erleichtern soll. Aber die Trocknung kann die Auflösung des Invertins befördern, zumal die enzymatischen Vorgänge während gewisser Trocknungen stark einsetzen. Die zur Trocknung und Koagulation der Eiweißkörper angewandten hohen Temperaturen (E. SALKOWSKI und M. BARTH) [19] sind unzulässig. Auch das Koagulieren der Hefeproteine durch Alkohol (W. A. OSBORNE) ist unnützlich. Trocknung der Hefe und darauffolgendes Ausziehen mit Wasser kann brauchbare Invertinlösungen liefern (W. DONATH, E. FISCHER, H. v. EULER), wenn Schädigungen (höheres Erwärmen, Verweilen in wasserhaltigem Alkohol) vermieden und das Ausziehen der Hefe, was beachtet werden sollte, unter Bedingungen des enzymatischen Abbaues und mit genügend großer Zeitdauer vorgenommen wird.

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65, 74 (1920).

Neben den zum Lösen des Invertins nötigen enzymatischen Vorgängen gehen einher proteolytische und amylolytische Vorgänge, die nicht den Invertingehalt, aber die Zusammensetzung und Brauchbarkeit der Invertinlösungen beeinflussen. Temperaturerhöhung beschleunigt die Überführung des Invertins in Lösung, wirkt aber ungünstig auf den Reinheitsgrad der Enzymlösung.

Nach den im folgenden mitgeteilten Erfahrungen ist die beschleunigte Autolyse nach C. S. HUDSON (auch schon ohne die weiteren Verbesserungen) das günstigste von den beschriebenen Verfahren; es ist rasch und liefert große Ausbeuten und reinere Lösungen als die anderen Verfahren.

2. Verhalten lebender Hefe gegen Wasser.

Wie schon JAMES O'SULLIVAN[1] gezeigt hat, gibt gesunde Hefe kein Invertin an Wasser ab. Auch H. v. EULER und O. SVANBERG[2] kamen zu diesem Resultat, als sie Hefe 6 Stunden bei 9° mit fließendem Wasser behandelten. Die Hefe zeigte dann dieselbe „Inversionsfähigkeit" wie zuvor; allerdings könnte Invertinverlust durch Neubildung kompensiert sein. Da E. SALKOWSKI[3] sein Verfahren, gummifreies Invertin darzustellen, auf **[20]** die vermeintliche Abgabe des Enzyms aus lebender Hefe gründete, so prüften wir in dieser Beziehung das Verhalten frischer Hefe.

Preßhefe wurde ohne besondere Reinigung mit dem 8fachen Gewicht Eiswasser angerührt. Nach 3 Stunden enthielt das Wasser 3% (± 2) und nach 45 Stunden (unter Eiskühlung) 5% (± 2) vom Invertin (Anhang Nr. 10 und 11).

Eine zweite Probe von Brauereihefe rührten wir mit dem doppelten Gewicht Eiswasser an und hielten die Temperatur während des Versuches bei 3 bis 4°. Das Wasser enthielt nach 8 Stunden 1,8 ± 1% und nach 36 Stunden ebenfalls 1,8 ± 1% vom Invertin. In diesen Fällen waren die angewandten Hefen nicht frei von abgestorbenen Zellen und die Filtrate nicht ganz klar, sie enthielten eine kleine Anzahl von Hefezellen. Der Versuch bestätigt, daß lebende Hefe kein Invertin abgibt.

Die Hefe des 2. Versuches gab bei 25 bis 30° unter sonst gleichen Bedingungen in 24 Stunden 10% ihres Invertins an das Wasser ab, wobei die Hefe schon etwas faulig zu werden begann (Anhang Nr. 12).

3. Invertinlösung aus kurz zerriebener Hefe[1]).

Nach L. MICHAELIS[2]) wird Preßhefe mit Sand verrieben, indessen nicht so vollkommen wie zur Zymasedarstellung (hier $2^1/_2$ bis 3 Minuten für 300 g), und dann 3 bis 6 Stunden mit Chloroformwasser ausgezogen. Wertvoll ist der Vorschlag, die

[1] Journ. chem. soc. **61**, 503 [1892].
[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. **106**, 201, 230 [1919].
[3] Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 124, und zwar S. 120 [1909].
[1]) Vgl. Abschnitt VII.
[2]) Biochem. Zeitschr. **7**, 488 [1907/08]; L. MICHAELIS und M. EHRENREICH, Biochem. Zeitschr. **10**, 283, 295 [1908]; L. MICHAELIS in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden [1910], III. Bd., S. 7.

Invertinlösungen mit Kaolin zu klären und von Eiweiß zu befreien. Vollständig gelingt allerdings die Beseitigung der Eiweißkörper auf diesem Wege nicht.
[21] Aus den quantitativen Angaben kann man schließen, daß die Extrakte nach MICHAELIS (Zeitwerte etwa 3000 bis 6000) 5 bis möglicherweise gegen 10% vom Hefeinvertin enthalten.

Noch ungünstiger ist die Vorschrift von G. BERTRAND und P. THOMAS[1], die kurz zerriebene Hefe 1/2 Stunde lang mit reinem Wasser auszuziehen.

4. Invertinlösung aus Hefepreßsaft.

J. MEISENHEIMER, ST. GAMBARJAN und L. SEMPER[2] finden in der Darstellung des Invertins aus dem Buchnerschen Hefepreßsaft den Vorzug großer Schnelligkeit und hoher Enzymausbeuten. Eine Reinigung des an genuinen Eiweißkörpern reichen Präparates, die den Wert um 50 bis 100% verbessert, wird durch Fällen der Proteine mit Schwefelsäure oder Oxalsäure erzielt. Da quantitative Angaben über die Invertinwirkung des Preßsaftes fehlen, so kann man nur die Bestimmung von O. SVANBERG[3] anführen, der das Verfahren auf seine besonders enzymreichen Hefen anwandte. In diesem Falle enthielt der mit Kaolin gereinigte Hefepreßsaft 5% vom Invertingehalt der Hefe, das Präparat erreichte den Minutenwert 7,5.

5. Invertinlösung aus Trockenhefen.

a) Verfahren von E. Salkowski und M. Barth[4].

Das Verfahren beruht darauf, daß beim Erhitzen der Hefe auf 100° „das Hefeeiweiß zum weitaus größten Teil in einen im Wasser unlöslichen Zustand übergeht; außerdem aber werden so die Hefezellen zerrissen und [22] das Ferment der lösenden Kraft des Wassers zugänglich gemacht".

Lufttrockene Hefe, die den unveränderten Enzymgehalt der frischen besaß, erwärmten wir auf 100° nur 3 Stunden. Die Bestimmung durch 2stündiges Verreiben ergab (Anhang Nr. 13) nur noch 46% vom ursprünglichen Invertin.

Für das Extrahieren wurde nach SALKOWSKI und BARTH 6 Stunden auf 105 bis 110° erhitzt. Die Ausbeute in der Lösung (die späteren Schädigungen, die das Verfahren bedingt, bleiben außer Betracht) war gering (Tab. 4). Wichtiger ist hier, daß der Heferückstand vom Filtrieren nach dem dreitägigen Extrahieren des Versuches 3 noch 29% (Anhang Nr. 18) der ursprünglichen Invertinmenge enthielt, d. i. fast dreimal mehr als die Invertinlösung. Unter denselben Umständen geben die schonend getrockneten Hefen mindestens 60% des Invertins frei. Das für die Freilegung des Invertins wichtige Enzym hat noch mehr als das Invertin selbst durch das Erhitzen gelitten.

[1] Guide de Chimie biologique. Paris 1913, S. 206.
[2] Biochem. Zeitschr. 54, 108 [1913].
[3] Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 65, und zwar S. 86 [1920].
[4] M. BARTH, Ber. d. d. chem. Ges. 11, 474 [1878]; E. SALKOWSKI, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 305 [1901]; 61, 124 [1909].

Tabelle 4. Invertinlösungen aus Trockenhefe von 105°.

	Verfahren des Extrahierens	Minutenwert der Hefe	Minutenwert des Auszuges bezogen auf Hefe	Invertinausbeute Proz.
Erste Hefenprobe (Anh. Nr. 14)	a) 22 Stunden bei Zimmertemperatur	ca. 250	10500	ca. 2
	b) 22 Stunden bei 30°		12000	ca. 2
Zweite Hefenprobe (Anh. Nr. 15)	24 Stunden bei 35°	ca. 250	1050	ca. 15
Dritte Hefenprobe (Anh. Nr. 16)	3 Tage bei Zimmertemperatur	350	3500	10
Vierte Hefenprobe, zuvor mit Alkohol entwässert (Anh. Nr. 17)	22 Stunden bei Zimmertemperatur	ca. 250	2200	ca. 11

[23] *b) Verfahren von W. A. Osborne*[1].

Mit ähnlicher Absicht wie das vorige Verfahren, nämlich um vor dem Ausziehen des Invertins die Eiweißkörper zu koagulieren, wurde die Hefe 16 bis 24 Stunden der Einwirkung von Alkohol unterworfen. Eine derartig vorbehandelte Hefe lieferte uns, mit dem gleichen Gewicht Chloroformwasser 7 Tage behandelt, nur etwa 16% (Anhang Nr. 19) des anfangs vorhandenen Invertins, d. i. nur einen Bruchteil der ohne die Vorbehandlung in Lösung gehenden Menge. Auch die mit Alkohol behandelte Hefe gibt also das Invertin, das noch vorhanden ist, viel schwieriger frei.

c) Invertinlösung aus Acetontrockenhefe.

Entwässert man die Hefe durch kurzes Behandeln mit viel Aceton, so gibt sie das Invertin wieder anormal schwierig an Wasser ab. Im Parallelversuch mit derselben Hefe, an der Luft getrocknet, gingen bei 35° in 24 Stunden 70,5% des Invertins der Frischhefe in Lösung; aus der fein gemahlenen Acetontrockenhefe nur 17% und in den folgenden 13 Tagen bei 20° noch weitere 38% (Anhang Nr. 20). Ein Versuch mit einem zweiten Präparat der Acetonhefe ergab in 24 Stunden bei 35° 23% Invertinlösung gegenüber 59%, die dieselbe Hefe in lufttrockenem Zustand in Lösung schickte (Anhang Nr. 21).

d) Invertin aus lufttrockener Hefe.

Nach H. v. Euler und B. af Ugglas[2] soll die Hefe gleich invertinhaltige Auszüge liefern, sei es, daß sie im Vakuum bei Temperaturen bis zu 80°, sei es, daß sie mit überschüssigem Alkohol getrocknet wurde.

Emil Fischers[3] Verfahren bestand darin, einen Teil lufttrockene Bierhefe (Typus Frohberg, Reinkultur) mit [24] 15 Teilen Wasser, dem 1% Toluol zugefügt war, bei 30 bis 35° unter zeitweisem Umschütteln auszuziehen.

Über die Ausbeute teilt H. v. Euler[4]) in der „Chemie der Hefe" mit: „Über den Grad der Extrahierbarkeit hat Verfasser Versuche angestellt, welche zeigen, daß aus geeignet getrockneten Präparaten der größte Teil der gesamten Enzymmenge

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 399 [1899].
[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 279, 282 [1910].
[3] Ber. d. d. chem. Ges. **27**, 2985 [1894]; vgl. auch Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 60, 74 [1898].
[4]) Leipzig 1915, S. 87.

gewonnen werden kann. Indessen variiert der extrahierbare Anteil sehr stark mit Typus, Rasse und Vorbehandlung der Hefe.

Eine genauere Angabe von H. v. EULER, E. LINDBERG und K. MELANDER[1] bezieht sich auf eine rasch und vorsichtig nur mit kurzer Temperatursteigerung auf 100° im Vakuum (also nicht unter den Bedingungen von E. SALKOWSKI) getrocknete Hefe. Das Ausziehen mit der 10fachen Menge Wasser bei Zimmertemperatur in 20 Stunden lieferte ein Fünftel der durch Autolyse der frischen Hefe in Lösung gebrachten Invertinmenge, d. i. höchstens 15% des Hefeenzyms. Etwas später gewannen EULER und KULLBERG[2] aus einer solchen Trockenhefe in 12 Stunden die Lösung von einem Viertel ihres Invertingehaltes und einem Achtel des Gehaltes der Frischhefe.

In unseren Versuchen wird die Ausbeute in einem aliquoten Teil des wäßrigen Auszuges ohne Rücksicht auf die abfiltrierbare Menge bestimmt und auf den Zeitwert der betreffenden Frischhefe bezogen. Wir behandelten die Trockenhefe in gemahlenem Zustand mit dem Zehnfachen an Wasser unter Zusatz von Toluol. An der Luft getrocknete Hefen lieferten in 24 Stunden bei 20° ungefähr 70 und 75% (Anhang Nr. 22 und 23), in 7 Tagen etwa 80% (Anhang Nr. 22), in anderen Versuchen bei 35° in 24 Stunden etwa 78, ferner 59, 71 und bei Fortsetzung in 8 Tagen 83% Invertin (Anhang Nr. 24, 25, 26).

[25] Es zeigt sich, daß sogar die Art und Weise des Trocknens an der Luft von erheblichem Einfluß ist, daß langsame Trocknung für die Freilegung des Invertins günstiger ist als die Fixierung des Protoplasmazustandes durch rasches Entwässern.

	Extraktion	Invertinausbeute
Hefe, durch Liegen an der Luft getrocknet	3 Tage bei 20°	81,5% (Anh. Nr. 27)
Hefe, in raschem Luftstrom von 20° getrocknet	3 „ „ 20°	56,0% (Anh. „ 28)
Hefe, ebenso	3 „ „ 20°	68,5% (Anh. „ 28)
Hefe, in raschem Luftstrom von 35° getrocknet	3 „ „ 20°	70,0% (Anh. „ 29)

6. Invertinlösung durch langsame Autolyse.

Die beste und wichtigste Methode in den Händen der Forscher, die über Invertin eindringender gearbeitet haben, ist die Darstellung von Auszügen nach C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON[3]) durch langsame und vollkommene Autolyse der unverdünnten, scharf abgepreßten Hefe (obergärige Brauereihefe war von ihnen angewandt) ohne Zusatz eines Antisepticums (oder bei Gegenwart von Toluol) in den Arbeiten von H. v. EULER, E. LINDBERG und K. MELANDER[4]), von H. v. EULER und S. KULLBERG[5]), von H. v. EULER und O. SVANBERG[6]), von O. SVANBERG[7]).

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 152–154 [1910].
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 85–94 [1911].
[3]) Journ. chem. soc. 57, 834 [1890].
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 152 u. 155 [1910].
[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 335 [1911].
[6]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 269 [1919].
[7]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 65–72 [1920].

In einem oder in zwei Monaten verwandelte sich die Hefe, ohne zu faulen, in ein schweres gelbes Liquidum ohne Gärwirkung, aber mit einer scheinbaren Zunahme an invertierender Wirkung. Von dieser verflüssigten Hefe filtrierten O'SULLIVAN und TOMPSON eine klare Lösung, „yeast liquor", die alles Invertin der [26] angewandten Hefe enthielt. O'SULLIVAN und TOMPSON[1] sprachen von einem „apparent increase" des Invertins der Oberhefe beim Stehen; es blieb aber zweifelhaft, ob nicht an dem Befunde die Ungenauigkeit der Invertinbestimmung in Frischhefe schuld trug. Es erschien zwar auch möglich, daß, solange die Hefe sich noch in lebendem Zustand befindet, Bildung von Invertin erfolgt, aber da in der abgestorbenen Hefe, in der verflüssigten Masse, noch ein weiterer Zuwachs einzutreten schien, so legten O'SULLIVAN und TOMPSON mehr Gewicht auf die Annahme, daß die Invertinbestimmung in frischer Hefe nicht genügend hohe Werte gab.

Die Methode der klassischen Arbeit ist hauptsächlich in den Untersuchungen H. v. EULERS und seiner Mitarbeiter fruchtbar geworden. Die Abänderungen, die vorgenommen wurden, waren Zusatz eines Antisepticums, meist Toluol, und eine gewisse Fraktionierung, indem bei EULER und SVANBERG der in den ersten vier Tagen gebildete Hefesaft verworfen wurde. Autolyse bei 35° lieferte einen weniger wirksamen Auszug. Den Reinheitsgrad der Autolysenflüssigkeit versuchten EULER und SVANBERG mittels der invertinreich gezüchteten Hefe zu steigern. Die Ausbeute an Invertin von O'SULLIVAN und TOMPSON ist in den späteren Versuchen, für die übrigens fast immer untergärige Hefe diente, nicht mehr erreicht und Zuwachs nie wieder beobachtet worden. Es ist uns wahrscheinlich, daß der Zusatz von Toluol nicht ohne Einfluß auf den Verlauf der Autolyse und auf eine Enzymbildung ist, und daß er in diesem Fall die Freilegung des Invertins nicht begünstigt.

Einen Nachteil bei der praktischen Gewinnung der Hefeflüssigkeit bedeuten nach H. v. EULER und O. SVANBERG[2] die großen Verluste, die dadurch verursacht werden, daß bei der Filtration vom festen Rückstand bei weitem nicht der gesamte Saft gewonnen wird, sondern auf dem Filter ein Brei hinterbleibt, welcher [27] bedeutende Saftmengen enthält. Aus 1 kg frischer Hefe werden nämlich nicht mehr als etwa 300 ccm Saft erhalten, in welchem sich nur 1/5 bis 1/4 der gesamten Saccharasewirkung der frischen Hefe vorfindet.

Für die Frage des Freiwerdens und des Lösungsvorganges ist interessanter das Verteilungsverhältnis des Invertins zwischen Saft und Rückstand, also die bei idealer Trennung in Lösung befindliche Enzymmenge.

Im oben angeführten Versuch von EULER und SVANBERG kann man berechnen daß sie in der theoretischen Extraktmenge von 700 ccm etwa 50% betrug. In einem anderen Falle vermochten EULER und SVANBERG[3]) aus 15 kg Preßhefe, die 10 l Wasser enthielten, in 3140 ccm Auszug 21,5% des Invertins abzutrennen, woraus sich ein

[1] a. a. O. S. 872.
[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 277 [1919].
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 290 [1919].

Invertinmenge von 69% der Fischhefe in der gesamten Hefeflüssigkeit berechnen läßt. Endlich läßt ein letzter Versuch von O. SVANBERG[2] auf den Übergang von 90% des ursprünglichen Invertins in einen Autolysensaft schließen.

Unsere geringen Erfahrungen mit dieser Methode stimmen mit denen von H. v. EULER überein. Untergärige Brauereihefe von 22% Trockengewicht blieb unter Zusatz von Toluol 30 Tage der Autolyse überlassen. Die gesamte entstandene Hefeflüssigkeit enthielt 78% vom Invertin der Hefe. Der Minutenwert der Hefe war nämlich 276, derjenige der Hefeflüssigkeit betrug 355, und der Zeitwert bezogen auf das Trockengewicht des Hefeauszuges war 250 (Anhang Nr. 30).

7. Invertinlösung durch beschleunigte Autolyse.

Um das Invertin für die von J. KJELDAHL[3] und C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON[4] vorgeschlagene Anwendung in der Clergetmethode der Rohrzuckeranalyse [28] leicht zugänglich zu machen, ersetzte C. S. HUDSON[5]) die einen Monat dauernde, langsame Autolyse durch den rascheren Lösungsvorgang, der unter Verflüssigung der Hefe bei der Behandlung mit Zellgiften und wenig Wasser einsetzte. Die Hefe wird mit gleichem Gewicht Wasser angeteigt und mit dem Zwanzigstel ihres Gewichtes an Toluol in einigen Stunden verflüssigt und in 3 bis 5 Tagen so weit autolysiert, daß die Invertinwirkung des Auszuges ihr Maximum erreicht. Da C. S. HUDSON die Rohrzuckerhydrolyse unter besonderen Bedingungen mißt (5 ccm Invertinlösung, 50 ccm 9proz. Saccharoselösung, 30°), bestimmten wir, um eine Brücke zwischen seinen und unseren Wertangaben herzustellen, für eine unserer Invertinlösungen die Wirkung unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition und unter HUDSONS Bedingungen. Dem Minutenwert 29 entsprach ein Hudsonscher Wert von 8,7. Die Hefeauszüge von HUDSON sind daher ungefähr durch Nulldrehungszeiten für 5 ccm von 19 Minuten (Oberhefe) und von 11,4 Minuten (Unterhefe) zu kennzeichnen, während der beste Hudsonextrakt aus unserer Hefe eine entsprechende Nulldrehungszeit von 24 ergibt.

Von unseren Erfahrungen über die Hudsonsche Methode bezieht sich ein großer Teil auf ein wenig andere Versuchsbedingungen, nämlich doppelt so viel Wasser; wir arbeiteten nach diesem Verfahren anfangs ohne Kenntnis der Abhandlung von HUDSON und verließen es nicht, weil die so erhaltenen Invertinlösungen bei der Adsorption und Elution günstige Resultate gegeben hatten. Aber bei der Hefe hat jede Änderung Einfluß. Unter den eigentlichen Bedingungen HUDSONS scheint (bei gedachter Filtration) die Ausbeute noch höher zu sein und rascher erreicht zu werden als in größerer Verdünnung. Zum Beispiel unterwarfen wir eine und dieselbe Hefe unter Toluolzusatz der Autolyse a) mit gleichem Gewicht, b) mit dem Zehnfachen

[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 81 [1920].
[3] Compt. rend. Carlsberg Laborat. Kopenhagen 1, 189 [1881].
[4] Journ. chem. soc. 49, 64 [1886]; 59, 46 [1891].
[5]) C. S. HUDSON und H. S. PAINE, Journ. Am. chem. soc. 32, 774 [1910]; C. S. HUDSON, Journ. Am. chem. soc. 36, 1566 [1914].

29] Wasser. Nach 5 Tagen enthielten die Auszüge von a) 147 und b) 103% vom ertin der Hefe.

Die Invertinlösung nach HUDSON, von der die Tab. 5 einige Beispiele anführt, et nicht nur den angestrebten Vorteil der raschen Darstellung, sie liefert auch besten Ausbeuten. Dies gilt für den gebildeten und auch infolge der guten Filtrierkeit für den praktisch gewonnenen Hefeauszug. Es ist nicht ausgeschlossen, daß n auch mit der langsamen Autolyse zu solchen Werten gelangen wird, aber dies noch nicht oder nicht mit Sicherheit erreicht.

abelle 5. Invertinlösung durch beschleunigte Autolyse (Zimmertemperatur).

	Dauer der Autolyse	Zeitwert der Hefe	Zeitwert des Auszugs (bezogen auf Hefe)	Ausbeute in Proz.
a) mit doppeltem Gewicht Wasser.				
ste Hefe (Anh. Nr. 31)	6 Tage	300	354	85
eite „ („ „ 32)	7 „	212	235	90
itte „ („ „ 33)	5	340	268	114
erte „ („ „ 34)	6	245	282	87
infte „ („ „ 35)	11	235	252	93
b) mit gleichem Gewicht Wasser.				
echste „ („ „ 36)	3 „	297	413	72
iebente „ („ „ 37)	3 „	305	368	83
chte „ („ „ 38)	3 „	364	280	130
Neunte „ („ „ 39)	5	437	344	127
ehnte „ („ „ 40)	3 „	327	380	86
lfte „ („ „ 41)	5	803	410	147

[30] V. Rasche Autolyse unter verschiedenen Bedingungen.

Um die günstigsten Verhältnisse für die abgekürzte Autolyse kennenzulernen, untersuchten wir den Einfluß der Zeitdauer, der Temperatur und der Reaktion des Mediums durch Bestimmung der Zeitwerte in den Auszügen. Die Bedingungen für die präparative Arbeit werden durch das Verhältnis zwischen den beiden Kurven bestimmt, welche einerseits die Minutenwerte auf Hefe bezogen und andererseits auf Trockengewicht bezogen in ihrer Abhängigkeit von der Versuchsdauer wiedergeben.

Hinsichtlich der Autolysendauer kamen wir zu analogen Ergebnissen wie O. SVANBERG[1] bei der langsamen Autolyse. Unter den Bedingungen: 2 Teile Wasser, 1 Teil Hefe gelangen, wie die Tab. 6 zeigt, die Minutenwerte der Invertinlösungen in etwa 7 Tagen zum Optimum; die Minutenwerte auf Trockengewicht bezogen sind anfangs ungünstiger und sie gestalten sich zu günstigen Endwerten in 4 bis 8 Tagen. Bei höherer Temperatur stieg der Invertingehalt des Auszuges viel rascher an, aber das Verhältnis von Trockenrückstand zur Wirksamkeit scheint ungünstig und die Ausbeute niedrig zu bleiben. Für die Bestimmungen (Anhang Nr. 42) diente dieselbe Hefe, deren Minutenwert 300 betrug.

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 65, 72 [1920].

Tabelle 6. Beschleunigte Autolyse bei 20° und 30°.

Dauer, Tage	Versuche bei 20°			Versuch bei 30°		
	Zeitwert auf Hefe bezogen.	Zeitwert auf Trockengew. bezogen	Ausbeute Proz.	Zeitwert auf Hefe bezogen	Zeitwert auf Trockengew. bezogen	Ausbeute Proz.
1	2800		11	635		47
4	390	188	77	425	300	70,5
6	354	200	85	390	352	77
8	330		91	390		77

[31] Die Geschwindigkeit des Lösungsvorganges differiert bei verschiedenen Hefeproben erheblich. Während im Versuch der Tabelle in einem Tag 11% vom Invertin der Frischhefe in den Auszug überging, betrug der gelöste Anteil bei einer anderen Hefelieferung (beide im November 1918) 36%. Nach 4 Tagen Versuchsdauer glichen sich die Unterschiede aus (Anhang Nr. 43).

In der Wärme ist diese Autolyse nicht anwendbar zum Lösen des Invertins. Bei 50,0° gingen in 2 Versuchen nur 8,3 und 8,9% des Invertins in den Auszug über (Anhang Nr. 44 und 45).

Einen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Autolyse kann man durch Einstellen schwach alkalischer Reaktion z. B. mit Ammoniak ausüben. Dadurch werden, wie der Vergleich der Invertinauflösung bei 0° und 20° in der Tab. 7 erkennen laßt, nicht nur die Adsorptionsverhältnisse im Zellinhalt und die Permeabilität der Zellwand geändert. Vielmehr sind die Unterschiede zwischen den Ausbeuten bei niederer und höherer Temperatur (wie auch schon in der Tab. 6) dadurch zu erklären, daß die Auflösung des Invertins auf einer Enzymwirkung beruht. Die Freilegung des Invertins verlauft bei Anwendung von Ammoniak schon bei 0° nicht wesentlich langsamer wie sonst bei Zimmertemperatur. Übrigens wird in der schwach ammoniakalischen Flüssigkeit die Endotryptasewirkung[1] sehr gehemmt; es geht infolgedessen in den ammoniakalischen Extrakt eine große Menge von unabgebautem Eiweiß über.

Fur die Versuche der Tab. 7 wurden von jeder Hefeprobe zwei Ansätze mit Ammoniak allein und zwei Parallelversuche mit Ammoniak und Diammonphosphat geprüft. Die Preßhefe schüttelten wir mit dem gleichen[32] Gewicht Wasser und 5% ihres Gewichtes an Toluol an und titrierten sie mit Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion; der Zusatz von sekundärem Ammonphosphat betrug 2% der Frischhefe.

Tabelle 7. Neutralextraktion bei 0° und 20°.

	Zeitwert der Hefe	Versuche bei 0°		Versuche bei 20°	
		Zeitwert der Invertinlösung auf Hefe bezogen	Ausbeute Proz.	Zeitwert der Invertinlösung auf Hefe bezogen	Ausbeute Proz.
Erste Hefeprobe (Anh. Nr. 46) . . .	355	1870	19	620	38,6
Dieselbe mit Phosphat		1870	19	560	63,5
Zweite Hefeprobe (Anh. Nr. 47) . .	328	2190	15	913	35,8
Dieselbe mit Phosphat		2075	15,8	713	46
Dritte Hefeprobe (Anh. Nr. 48) . .	318	2240	14	400	78
Dieselbe mit Phosphat		2450	12,7	390	80

[1] Vgl. M. HAHN und M. GERET in E. BUCHNER, H. BUCHNER und M. HAHN, Die Zymasegärung, München 1903, S. 287, 319.

Die Differenzen zwischen gleichartigen Versuchen sind bei Anwendung von Ammoniak größer als sonst; zum Teil sind sie bedingt durch die verschiedene Art des Zusatzes von Ammoniak. Die ganzen Ammoniakmengen, die zur Neutralisation der entstehenden Säure nötig waren, wurden entweder anfangs auf einmal hinzugefügt oder vorsichtig in einzelnen Anteilen entsprechend dem Gang der Säurebildung in der Hefe. Aus dem Vergleich in der Tab. 8 geht hervor, daß das letztere Verfahren der Neutralextraktion rascher wirkt als die Gegenwart des nötigen oder überschüssigen Ammoniaks vom Versuchsbeginn an.

[33]
Tabelle 8. Gang der Invertinauflösung bei raschem und langsamem Neutralisieren.

	Temperatur	(Ausbeute in Proz.) 24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
Hefe, rasch ammoniak. (Anh. Nr. 46)	20	38,6	79	140
Hefe, rasch ammoniak. (Anh. Nr. 47)	25	35,8	66	
Hefe, langsam ammoniak. (Anh. Nr. 49)	12	60	122	
Hefe, langsam ammoniak. (Anh. Nr. 48)	25	78		87,5
Hefe, langsam ammoniak. (Anh. Nr. 50)	15		112	112

Der Zusatz von Diammonphosphat beim Neutralverfahren bedeutet keine Verbesserung für den Fall der allmählichen Neutralisation. Wohl wird aber bei gesamtem Zusatz des Ammoniaks von Versuchsbeginn an die störende Wirkung des anfangs überschüssigen Alkalis, wie die Tab. 9 zeigt, aufgehoben vom Phosphat, das hier als Puffer wirkt.

Tabelle 9.

	rascher Ammoniakzusatz: 1. Hefe (Anh. Nr. 46)	2. Hefe (Anh. Nr. 47)	langsamer Ammoniakzusatz: 3. Hefe (Anh. Nr. 48)
ohne Phosphat	38,6	35,8	78,5
mit Phosphat	63,5	46	80

Dagegen ist die Auflösung des Invertins unter den Bedingungen von Hudson mit Zusatz nur von Diammoniumphosphat (Hefe mit gleichem Gewicht Wasser, 5 bis 10% Toluol und 2,5% der Frischhefe an [34] Phosphat) mindestens so günstig wie das Neutralextrahieren mit Ammoniak. So entstanden nämlich Invertinlösungen (Tab. 10) mit Zeitwerten, die zu den günstigsten bisher beobachteten zählen.

Tabelle 10. Invertinlösung durch beschleunigte Autolyse mit Phosphatzusatz.

	Dauer	Zeitwert der Hefe	Zeitwert der Invertinlösung	Ausbeute Proz.
Erste Hefe (Anh. Nr. 51)	3 Tage	315	300	105
Zweite Hefe (Anh. Nr. 52)	3	288	357	81
Dritte Hefe (Anh. Nr. 53)	5	250	191	131
Vierte Hefe (Anh. Nr. 54)	5	312	155	205

Auch der Zusatz von Calciumcarbonat zum Autolysenansatz nach HUDSON wirkt günstig, nicht ebenso brauchbar scheint Magnesiumoxyd zu sein.

Das Neutralisationsverfahren hat für die Auflösung des Invertins die Bedeutung, daß die bei der Hefeabtötung durch das Zellgift sich bildenden Säuren unschädlich gemacht werden. Wenn sie auch dem Invertin nicht schaden, so erfolgt doch die Freilegung desselben besser in neutralem als in schwach saurem Medium, was den Vorgang von den endotryptischen Reaktionen bei der Hefeautolyse unterscheidet. Daher finden wir im allgemeinen (s. die Tab. 11), daß die Gewinnung der Invertinlösungen, wenn es sich nur um den Enzymgehalt, nicht um Brauchbarkeit für die Reinigung mit Adsorptionsmitteln handelt, unter Neutralisation günstiger ist als unter den genauen Bedingungen der beschleunigten Autolyse von HUDSON.

[35] Tabelle 11. Rasche Autolyse mit und ohne Ammoniak.

	Dauer	Hefezeitwert	a) nach HUDSON: Zeitwert d. Invertinlös. auf Hefe bezogen	a) nach HUDSON: Invertinausbeute Proz.	b) mit Ammoniakzusatz: Zeitwert d. Invertinlös. auf Hefe bezogen	b) mit Ammoniakzusatz: Invertinausbeute Proz.
Erste Hefe (Anh. Nr. 55), bei b) mit doppelter Wassermenge	3 Tage	207	413	72	270	110
Zweite Hefe (Anh. Nr. 56)	3	ca. 240	240	ca. 100	240	ca. 100
Dritte Hefe (Anh. Nr. 57), bei b) mit doppelter Wassermenge	3	305	368	83	300	78,5
Vierte Hefe (Anh. Nr. 58), bei b) mit doppelter Wassermenge	5	303	280	130	225	164
Fünfte Hefe (Anh. Nr. 59), bei a) mit doppelter Wassermenge	3	240	282	87	268	90

VI. Invertinbildung in abgetöteter Hefe.

Bei der beschleunigten Autolyse fanden wir, wie die Versuche im vorigen Abschnitt und im folgenden zeigen, öfters in den Auszügen mehr Invertinwirkung als in den angewandten Hefen. Unter 27 auf rasche Autolyse verarbeiteten Hefeproben ergab die Verarbeitung von 14 Proben Zuwachs an Inversionsvermögen. Gewöhnlich waren es Hefen von schlechtem Invertingehalt, die diese Erscheinung zeigten. Nur in zwei von den Zuwachsfällen hatte die Ausgangshefe einen günstigeren Zeitwert als 300, während in 10 von den 13 Fällen der Extraktion ohne Zunahme die angewandte Hefe bessere Minutenwerte als etwa 300 aufwies.

Die Zunahme an Invertinwirkung ist entweder durch die Beseitigung oder Abschwächung eines Hemmungskörpers oder durch die postmortale Bildung*) des Enzyms aus einer inaktiven Vorstufe, einem Zymogen, zu erklären.

[36] Die Annahme, daß beim Abtrennen der Autolysenflüssigkeit mit den Heferückständen ein Hemmungskörper beseitigt wird, verliert an Wahrscheinlichkeit durch Versuche, in denen wir ohne Abtrennung eines Extraktes Zunahme an invertierender

*) *Die Annahme, daß diese Enzymbildung postmortal erfolge, wurde in der IX. Abh. zur Kenntnis des Invertins (Abh. 54) berichtigt.*

Wirkung feststellten. 2 g Hefe wurden unter wechselnden Bedingungen mit Wasser und Zellgift stehen gelassen und dann zusammen mit der umgebenden Flüssigkeit für dieselbe Bestimmung verwendet, wie sie im Abschnitt III für Frischhefe beschrieben wurde. Das Ergebnis schien mehr von der Beschaffenheit der Hefe als von den Versuchsbedingungen abzuhängen.

1. Versuch. Hefe vom Zeitwert 280 ergab nach 2tägigem Stehen mit 2 ccm Wasser, Toluol und 0,04 g Diammonphosphat den Minutenwert 295, also 95% des Invertins (Anhang Nr. 60).

2. Versuch. Hefe vom Zeitwert 603 ergab, mit 2 ccm Wasser und Toluol versetzt, nach 45 Minuten den Zeitwert 568, nach 1 Tag 535, entsprechend 106 und 112% Ausbeute (Anhang Nr. 61).

3. Versuch. a) Hefe vom Zeitwert 245 wurde 5 Tage mit 2 ccm Wasser und 0,2 ccm Toluol stehengelassen. Der Zeitwert war dann 195.

b) Mit 2 ccm Wasser und mit Essigester sowie Toluol und 0,05 g Diammonphosphat versetzt; ebenfalls nach 5 Tagen wurde gefunden: Zeitwert 194 (Anhang Nr. 62).

In beiden Fällen betrug die Invertinwirkung 125% von der ursprünglichen.

Beim Zerreiben der frischen Hefe pflegt eine derartige Vermehrung der enzymatischen Wirksamkeit nicht einzutreten, denn die Bestimmungen mit zerriebener Hefe waren gute Bestätigungen der Invertinbestimmung in frischer Hefe. Als aber die Hefe vom 2. Versuch, eine besonders invertinarme (Minutenwert 603) Hefe (17. Dezember 1919 von der Brauerei nach mehrwöchentlichem Stilliegen des Gärbetriebes geliefert), mit der 2- bis [37] 3fachen Menge Seesand 2 Stunden kräftig zerrieben und mit Wasser ½ Stunde geschüttelt wurde, lieferte sie 119% (: 4) des ursprünglichen Invertins (Anhang Nr. 67).

Da man nie eine Hemmung des Invertins, günstige Wasserstoffzahl vorausgesetzt, gefunden hat, wird die einfachere Erklärung den Vorzug verdienen, daß die Zunahme an Invertinwirkung mit Invertinbildung aus einem Zymogen gleichbedeutend ist. Dann bedeuten die Beobachtungen, daß die Hefezelle oft nur fertiges Invertin enthält und öfters neben dem fertigen in untergeordnetem Maße eine Vorstufe desselben.

VII. Über die Freilegung des Invertins.

Das Verhalten der unter verschiedenen Bedingungen an der Luft oder in der Wärme getrockneten und der mit Aceton entwässerten oder mit Alkohol vorbehandelten Hefe und die Abhängigkeit des Lösungsvorganges von der Temperatur ließ vermuten, daß der Auflösung des Invertins ein enzymatischer Prozeß vorausgehe. Da bei der durch Zusatz von Ammoniak abgeänderten Hudsonschen Methode der Abbau der Eiweißkörper durch Endotryptase gehemmt, die Auflösung des Invertins aber befördert wird, so ist die Freilegung des Invertins wahrscheinlich eine einzelne, getrennt von den Hauptvorgängen der Autolyse verlaufende, andere Wasserstoffionenkonzentration erfordernde Reaktion. Sie verläuft glatt in neutralem Medium und wird durch Säure beeinträchtigt. Das Invertin freilegende Enzym scheint gegen Säure

ähnlich empfindlich zu sein wie Maltase, sogar noch empfindlicher. Nach einer Arbeit von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[1] gelingt es, die Maltase der frischen Hefe quantitativ zu bestimmen durch rasche Verflüssigung mit Essigester, Neutralisieren der gebildeten Säure und Einwirkung auf Maltose unter Pufferzusatz. [38] Aber unter denselben Bedingungen, die für die Maltase noch erträglich sind, leidet die Einrichtung für die Freilegung der Maltase[1]) und der Saccharase. Auch bewirkt für die Freilegung der Zusatz von gefälltem Calciumcarbonat einen weniger wirksamen Schutz als für die Maltase selbst.

Die Beobachtungen sind mit der herrschenden Annahme[2]) unvereinbar, daß das Invertin anders als Zymase nach der Abtötung der Hefe frei liege. Am deutlichsten sprechen für einen örtlichen Schutz oder für eine Verankerung des Invertins an eine unlösliche Komponente, nicht so sehr für eine wirkliche chemische Bindung als eher für einen Adsorptionszustand, die Löslichkeit des Invertins beim Verreiben der Hefe und die Lösungserscheinungen bei Anwesenheit verschiedener Zellgifte.

a) Löslichkeit des Invertins der zerriebenen Hefe.

Es ist unbekannt, wie es sich mit der Löslichkeit des Invertins frischer Hefe beim Zerreiben verhält, nur der Invertingehalt in der zerriebenen Hefe selbst war bisher geprüft. Nun erweist sich der lösliche Anteil des Invertins, der nach sichtlicher Verletzung der Zellstruktur rasch in Lösung gebracht werden kann, als überraschend klein (Tab. 12). Der unmittelbar lösliche Anteil stellt auch das Maximum dessen dar, was in den Hefepreßsaft übergeht. Neben diesem [39] auffallenden Ergebnis treten die differierenden Einzelheiten der Versuche an Bedeutung zurück. Natürlich erschienen die Versuche durch den physiologischen Zustand der Hefe stark beeinflußt. Es spielt auch die im vorigen Abschnitt behandelte postmortale Neubildung des Invertins mit herein, worauf das abweichende Ergebnis des schon oben besprochenen Versuchs 5 der Tab. 12 zurückzuführen ist.

Die Hefe wurde mit verschiedenen Mengen Seesand kräftig zerrieben und mit verschiedenen Mengen Wasser (mit dem doppelten bis zehnfachen Gewicht) gleich lange (1/2 Stunde) ausgelaugt. Obwohl nach dem mikroskopischen Bilde die Verletzung der Hefezellen rasch gelingt, wird die Invertinausbeute im Filtrat sehr klein, wenn man nur darauf ausgeht, die Hefezelle zu zerreißen und sie steigt, wenn mit größerer Sandmenge energisch zerrieben wird.

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. 111. 157 [1920].

[1]) Nach unveröffentlichten Versuchen von WILLSTÄTTER und STEIBELT (*Abh. 62*).

[2]) O. SVANBERG und H. v. EULER, Fermentforschung 4. 90 [1920], drückten vor kurzem, als sie den hemmenden Einfluß von Kupfersulfat auf die Autolyse der Hefe und die Auflösung des Invertins untersuchten, ihre Anschauung folgendermaßen aus:

„Diesen Effekt des Kupfersalzes könnte man etwa damit erklären, daß die Abscheidung des Enzyms mit einem enzymatischen Vorgang verknüpft ist, der vom Kupfer gehemmt wird. Indessen deuten — wie der eine von uns mehrfach hervorgehoben hat — zahlreiche andere Tatsachen darauf hin, daß die Saccharase in der lebenden Hefezelle zum großen Teil schon in freiem Zustand vorkommt."

Tabelle 12. Lösbares Invertin in zerriebener frischer Hefe.

Nummer	Versuchsanordnung	Dauer des Verreibens Stunden	Zeitwert der Hefe	Zeitwert der filtr. Invertinlös. auf Hefe bezogen	Invertin im Filtrat in Proz.
1. (Anh. Nr. 63)	100 g Hefe mit 50 g Seesand und 200 ccm Wasser	1/2	258	1950	13
2. (Anh. Nr. 64)	50 g Hefe mit 50 g Seesand a) mit 100 ccm Wasser	a) 1/2	330	1280	26
	b) „ 500 „ „	b) 1		1080	31
3. (Anh. Nr. 65)	50 g Hefe mit 50 g Seesand und 200 ccm Wasser	3/4	350	660	51
4. (Anh. Nr. 66)	25 g Hefe mit 50 g Seesand und 250 ccm Wasser	a) 3/4	285	375	76,5
		b) 2 1/2		365	78
5. (Anh. Nr. 67)	10 g Hefe mit 25 g Seesand und 100 ccm Wasser	2	603	505	119

[40] Auch beim Zerreiben getrockneter Hefe unter Befeuchten ist der rasch mit Wasser lösbare Anteil gering (unten Versuch 1 und 2a), was in Anbetracht der Schwierigkeit zu erwarten war, die ja schon die Invertinbestimmung in getrockneter Hefe ohne Extrahieren geboten hat. Bei langer Dauer des Zerreibens der befeuchteten Trockenhefe steigt nicht nur der überhaupt bestimmbare, sondern auch der rasch extrahierbare Anteil bedeutend an; während des Zerreibens dürfte sich mehr und mehr die enzymatische Freilegung vollziehen.

	Dauer des Zerreibens Stunden	liefert im Auszug Invertin Proz.
1. Hefe, im Luftstrom von 33° getrocknet (Anh. Nr. 68) . .	1/2	33
2. Hefe, mit Alkohol und Äther getrocknet (Anh. Nr. 69) .	a) 1/2	56
	b) 1 1/2	71
3. Hefe, durch Liegen an der Luft getrocknet (Anh. Nr. 70)	2	91
4. Hefe, im Luftstrom von 55° getrocknet (Anh. Nr. 71) . .	2	78

b) Löslichkeit des Invertins nach Hefeverflüssigung durch verschiedene Zellgifte.

C. S. Hudson[1] bewirkte die rasche Autolyse durch Verflüssigung der Hefe mit verschiedenen abtötenden Mitteln wie Chloroform, Äther, Toluol, Essigester, Aceton. Bei seiner Darstellung der Invertinlösung erzielte Hudson eine bedeutende Verbesserung der invertierenden Wirkung im Extrakt, als er das anfangs angewandte Chloroform durch Toluol ersetzte. In einer Fußnote erwähnte er, daß die Anwendung von Essigester, obwohl derselbe nach den amerikanischen Patenten 785733 und 785734 besonders geeignet sein soll, um die Inhaltsstoffe der Hefe herauszulösen, zu sehr schwachen Invertinlösungen führe.

[41] In der Tat ist die Löslichkeit des Invertins bei der Abtötung der Hefe mit verschiedenen Mitteln merkwürdig ungleich. Seine Löslichkeit scheint desto geringer zu sein, je rascher das Zellgift die Verflüssigung der Hefe bewirkt hat. Dieses Ver-

[1] Journ. Am. chem. soc. 36, 1566, 1568 [1914].

halten ist nicht erklärt worden; es wird kaum anders zu verstehen sein, denn als eine Beeinflussung des enzymatischen Vorganges der Invertinfreilegung. Die Freilegung des Invertins wird durch gewisse Zellgifte nicht nur gehemmt, sie wird verhindert. Denn wenn wir die mit Essigester eingeleitete rasche Autolyse nach Abtrennung der Flüssigkeit unter Anwendung von Toluol fortsetzen, so wird kein Invertin mehr in Lösung gebracht, obwohl das Enzym noch unversehrt in den Heferückständen enthalten ist. Auch nach Verreiben der Hefe wird beim Befeuchten mit Essigester kein weiteres Invertin löslich. Die Unlösbarkeit des Invertins bei Anwesenheit von Essigester braucht dennoch nicht auf einer spezifischen Giftwirkung zu beruhen, sondern bei der Abtötung der Hefe setzt Säurebildung ein, bei Toluol langsam, rasch bei Essigester, während Chloroform zwischen beiden steht. Nur bei der Hefeverflüssigung mit Toluol kommt es, da die Säure langsam auftritt und zugleich wegdissoziiert, zu keiner bedeutenden und für die Freilegung gefährlichen Säurekonzentration. Es war daher möglich, Invertin doch auch bei Verflüssigung der Hefe mit Essigester in guter Ausbeute zu gewinnen, wenn durch Neutralisation mit Ammoniak oder anderen Mitteln die bei der Abtötung gebildete Säure unschädlich gemacht wurde.

Versuche mit Essigsäureäthylester.

Preßhefe verwandelt sich beim Vermischen mit etwas Essigester innerhalb einer oder in wenigen Minuten in einen dünnen Brei. Auch wenn die Hefe zuerst mit dem gleichen Gewicht Wasser angeschüttelt wurde, so erfolgt auf Zusatz von Essigester (10 ccm auf 100 g Hefe) in einigen Minuten schon deutliche und mit der [42] Zeit rasch fortschreitende Verflüssigung, während der Zustand merklicher Verflüssigung bei Chloroform in einer halben Stunde, bei Toluol erst in 2 bis 3 Stunden erreicht wurde.

Zur Extraktion wurde die Hefe mit dem gleichen Gewicht Wasser und dann mit Essigester versetzt und zwar bei den späteren Versuchen der Tab. 13 immer mit 10 ccm auf 100 g, während bei den ersten Versuchen Differenzen in den Essigestermengen vorkamen, die möglicherweise nicht ohne Einfluß waren. Abgesehen von den ersten Versuchen war der Essigester immer besonders gereinigt und kam neutral reagierend zur Anwendung. Die Tab 13 zeigt, daß die Ausbeute bei der Essigesterautolyse durch verschiedene Neutralisationsmethoden oft, aber nicht durchwegs gesteigert werden konnte.

Tabelle 13. Invertinlösung durch rasche Autolyse unter Zusatz von Essigester.

Hefeprobe	Versuchsanordnung	Zeitwert der Hefe	Invertinausbeute im Filtrat (in Proz.) nach 3 Tagen	nach 5 Tagen
1 (Anh. Nr. 72)	Essigester, sauer reagierend	ca. 140	ca. 28	ca. 37
2 (Anh. Nr. 73)	Essigester, neutral reagierend	305	6,6	—
3 (Anh. Nr. 74)	a) mit sauer reagierendem Essigester	363	44,7	
	b) mit neutral reagierendem Essigester		53	
	c) mit allmähl. NH_3-Zusatz neutral gehalten		82	71

Hefeprobe	Versuchsanordnung	Zeitwert der Hefe	Invertinausbeute im Filtrat (in Proz.) nach 3 Tagen	nach 5 Tagen
4. (Anh. Nr. 75)	unter Zusatz von 5 g $CaCO_3$ auf 100 g . . .	417	76	—
5. (Anh. Nr. 76)	a) unter Zusatz von 5 g MgO auf 100 g . .	100	10	15
	b) unter Neutralisieren mit NH_3		17	31
6. (Anh. Nr. 77)	a) mit 3,3 g $KHCO_3$ auf 100 g	410	26	24
	b) ebenso, unter Durchleiten von CO_2 . . .		36.2	35
[43]	c) unter Neutralisieren mit NH_3		14.7	16
7. (Anh. Nr. 78)	unter Neutralisieren mit NH_3	350	48.5	
8. (Anh. Nr. 79)	unter Zusatz von 2.5 g $(NH_4)_2HPO_4$	327	50	
9. (Anh. Nr. 80)	a) ohne Zusatz	603		10
	b) mit der 10fachen Menge Wasser . . .			12
10. (Anh. Nr. 81)	ohne Zusatz	285		5
11. (Anh. Nr. 82)	a) ohne Zusatz	245		8.5
	b) mit der 10fachen Menge Wasser			7.5

In den nach der Essigesterautolyse abfiltrierten Heferückständen ermittelten wir unter den üblichen Bedingungen der quantitativen Bestimmung, so wie wenn es frische Hefe wäre, das Invertin. Obwohl man so gewiß nicht den wahren Betrag des vorhandenen Enzyms bestimmen kann, waren die gefundenen Invertingehalte noch groß (Tab. 14). Mit diesen Heferückständen setzten wir nun die Autolyse bei Gegenwart von Toluol lange fort und zwar so, daß die mit Essigester autolysierte und ausgewaschene Hefe mit gleich viel Wasser, wie der erste Auszug enthielt, aufgeschlämmt und mit 10% Toluol versetzt wurde. Aus der letzten Reihe der Tab. 14 geht hervor, wie wenig Invertin bei dieser weiter geführten Autolyse noch in Lösung gebracht werden kann.

[44] Tabelle 14. Invertinlösung durch sukzessive Autolyse mit Essigester und Toluol.

Hefeprobe	Dauer der weiteren Autolyse mit Toluol	Invertinlösung mit Essigester bezogen auf die frische Hefe Proz.	Invertin in den Heferückständen nach Essigesterautolyse Proz.	Invertinlösung durch fortgesetzte Autolyse mit Toluol Proz.
Nr. 2 der Tab. 13 (Anh. Nr. 73)	2 Tage	6.6		<2
Nr. 1 der Tab. 13 (Anh. Nr. 72)	–	ca. 37	ca. 25	–
Nr. 7 der Tab. 13 (Anh. Nr. 78)	3 Tage	48.5	16	8
Nr. 6 der Tab. 13 (Anh. Nr. 77)		16	125	
Nr. 10 der Tab. 13 (Anh. Nr. 81)	4 Tage	5	74	2
Nr. 11a der Tab. 13 (Anh. Nr. 82)	10 Tage	8.5	74	4
Nr. 11b der Tab. 13 (Anh. Nr. 82)	10 Tage	7.5	76	3
Zerriebene Hefe, Nr. 2 der Tab. 15 (Anh. Nr. 65)	4 Tage	45	70	2

Versuche des Zerreibens und darauffolgender Behandlung mit Essigester.

Der Zustand, in dem das Invertin im Augenblick der Abtötung des Pilzes vorhanden ist, läßt sich durch geeignete Behandlung mit Essigester fixieren, während bei Gegenwart von Toluol weiter das unlösliche Invertin in lösliches übergeht. Dazu stimmt auch die Löslichkeit des Invertins nach dem Zerreiben der Hefe. Unsere Versuche, bei Gegenwart der verschiedenen Antiseptica zu autolysieren, schlossen sich an die

Prüfung der Extrahierbarkeit beim Verreiben an. Von den Hefeproben der Versuche 1 und 3 der Tab. 12 verrieben [45] wir je 50 g mit 50 g Seesand entsprechend jenen Versuchen 30 und 45 Minuten lang und versetzten den Brei mit 100 ccm Wasser und 10 ccm von Essigester oder anderem Zellgift, um ihn 4 Tage lang der Autolyse zu überlassen.

War die Hefe reichlich lang genug zur Verletzung der Zellstruktur mit Sand zerrieben, so löste sich doch nur ein Teil des Invertins rasch in reinem Wasser, bei Gegenwart von Essigester auch bei langer Dauer nicht mehr (Tab. 15), bei Gegenwart von Toluol viel mehr. Durch mehrere Stunden dauerndes kräftiges Zerreiben wurde, wie oben gezeigt, die Menge des rasch löslichen Invertins gesteigert; auch dann lieferte längere Autolyse mit Essigester keinen Zuwachs an löslichem Invertin.

Tabelle 15.
Löslichkeit d. Invertins aus zerriebener Hefe bei d. Autolyse m. Essigester od. Toluol.

Nr.	Versuch	Dauer des Zerreibens Stunden	Ausbeute an sofort löslichem Invertin Proz.	Ausbeute in viertägiger Autolyse mit Essigester Proz.	Ausbeute in viertägiger Autolyse mit Toluol Proz.
1 (Anh. Nr. 63)	Vers. 1 von Tab. 12 .	½	13	19	92
2 (Anh. Nr. 65)	Vers. 3 von Tab. 12 .	¾	51	48	103
3 (Anh. Nr. 66)	Vers. 4b von Tab. 12 .	2½	78	71	

Versuche mit Essigester—Toluol-Mischung.

Die vom Essigsäureester bei der Auflösung des Invertins hervorgerufene Schädigung war vermindert (Tab. 13) beim Neutralisieren der auftretenden Säure; sie wird ganz vermieden, wenn man bei der Einwirkung auf die Hefe außerdem den Essigester mit dem gleichen Volumen Toluol verdünnt. Auch unter diesen Umständen wird rasch weitgehende Verflüssigung der Hefe erreicht.

[46] Je 300 g Hefe wurden mit 300 ccm Wasser unter Zusatz von 15 ccm Toluol und 15 ccm Essigester mit oder ohne Puffer, dessen Menge meistens 2,5% von der Hefe betrug, angeschüttelt und nach 3 bis 5 Tagen filtriert.

Tabelle 16. Invertinlösung mit Ammonphosphat—Essigester—Toluol.

Versuchsanordnung	Zeitwert der Hefe	Zeitwert der Invertinlösung	Ausbeute mit Essigester—Toluol Proz.	Ausbeute im Vergleichsversuch mit Toluol allein Proz.
Erste Hefe, mit Ammonphosphat, 3 Tage (Anh. Nr. 83)	315	300	105	105
Zweite Hefe, mit Ammonphosphat, 5 Tage (Anh. Nr. 84)	312	143	219	205
Dritte Hefe, mit Ammonphosphat, 3 Tage (Anh. Nr. 85)	310	187	166	
Dieselbe, mit Natriumphosphat, 3 Tage .		195	160	
Vierte Hefe, mit Ammoniak, 3 Tage (Anh. Nr. 86)	410	326	126	
Fünfte Hefe, mit Calciumcarbonat[1], 3 Tage (Anh. Nr. 87)	350	525	66,5	

[1] Mit Toluol allein (siehe Abschn. V) wirkt Calciumcarbonat günstiger als bei der rascheren Verflüssigung mit Essigester—Toluol.

Durch diese rasche Autolyse bei Gegenwart von Ammoniumphosphat und Essigester + Toluol gewinnen wir die invertinreichsten Auszüge (Tab. 16); indessen scheint in diesen Versuchen kein erheblicher Vorteil auf der Gegenwart von Essigsäureester neben Toluol zu beruhen.

[47] Tabelle 17. Rasche Autolyse unter Anwendung von Chloroform.

Nr.	Versuchsanordnung	Zeitwert der Hefe	Invertinlösung mit Chloroform		Invertinlösung mit Toluol	
			Zeitwert auf Hefe bez.	Ausbeute Proz.	Zeitwert	Ausbeute Proz.
1. (Anh. Nr. 88)	Hefe ohne Zusatz, 3 Tage	363	545	66,6	280	130
2. (Anh. Nr. 89)	Hefe ohne Zusatz, 3 Tage	327	1000	30	380	86
3. (Anh. Nr. 90)	Hefe 100 g mit 5 g Calciumcarbonat, 3 Tage	417	650	64	300	140
4. (Anh. Nr. 91)	Hefe ohne Zusatz, 3 Tage	ca. 360	1200	ca. 30		
	Dieselbe mit Ammonphosphat, 3 Tage		515	ca. 70		
5. (Anh. Nr. 92)	Hefe ohne Zusatz, 3 Tage	ca. 360	1200	ca. 30		
	Dieselbe mit Ammonphosphat, 3 Tage		462	ca. 78		
6. (Anh. Nr. 93)	Hefe mit Ammonphosphat, 5 Tage	288	293	98,5	357	85
7. (Anh. Nr. 94)	Hefe mit Ammonphosphat, 5 Tage	250	260	96	161	131
8. (Anh. Nr. 95)	Hefe mit Ammonphosphat, 5 Tage	312	189	165	153	205

[48] Versuche mit Chloroform.

Nach C. S. HUDSON liefert die rasche Autolyse bei Gegenwart von Chloroform viel geringere Invertinausbeute als mit Toluol. Da wir diesen Unterschied, den die Versuche 1 und 2 der Tab. 17 bestätigen, auf die Schädigung des invertin-freilegenden Enzyms zurückführen, so suchen wir ihn durch Neutralisieren der bei der ziemlich raschen Hefeabtötung entstehenden Säure zum Verschwinden zu bringen. Mit Calciumcarbonat gelingt es nicht, weil dieses nicht in die Hefezelle gelangt. Dagegen bewirkt Ammoniumphosphat, von dem wir 2,5 g auf 100 g Hefe anwenden, daß das Invertin mit hoher Ausbeute in Lösung geht (Tab. 17, Nr. 6 bis 8), wenn auch meist nicht in ebenso hoher wie bei Anwendung von Toluol.

VIII. Zur Freilegung der Begleitstoffe.

Die Begleitstoffe des Invertins, die den Gang der Reinigung, namentlich die Adsorption des Enzyms und seine Elution aus dem Adsorbat beeinflussen, gehen aus der Hefe ebensowenig durch einfache Extraktion hervor, wie das Invertin selbst. Vielmehr spielen auch hier enzymatische Abbauvorgänge eine große Rolle, und es lassen sich sogar in dem allgemeinen Wirrsal des Protoplasmaabbaues einzelne enzymatische Vorgänge bestimmen, leiten und unterdrücken, die gewisse Begleitstoffe in die Lösung überführen.

Soweit es sich um Begleitstoffe aus der Klasse der Eiweißkörper im weitesten Sinne handelt, wurde im vorausgehenden schon angedeutet, daß das Invertin der

Autolyse von O'SULLIVAN und TOMPSON und der raschen Autolyse nach HUDSON **von vielen Reaktionsprodukten des Eiweißabbaues durch Endotryptasen, von Peptiden und Aminosäuren, begleitet wird, und daß es arm an genuinen Proteinen oder frei von ihnen ist.** Die Unterdrückung der Endotryptase im Verfahren der Neutralextraktion (mit Ammoniak oder Ammonium- bzw. Natriumphosphat) **[49]** lieferte uns dagegen an höher molekularen Eiweißkörpern reiche, an abgebauten arme Invertinlösungen. Das Verhalten des Invertins in den bei saurer Reaktion und in den bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion dargestellten Auszugen ist so verschieden, daß es nicht möglich ist, für die im Kapitel B beschriebene Reinigung mit Aluminiumhydroxyd den Extrakt nach HUDSON durch die schönen, invertinreichen, bei neutraler Reaktion gebildeten Hefeauszüge zu ersetzen.

Die nach der Autolyse von den Heferückstanden abfiltrierten Invertinlösungen ändern beim Stehen ihre Zusammensetzung. Das gilt namentlich für die nach HUDSON dargestellten, sauer reagierenden Hefeflüssigkeiten. In ihnen setzt sich die Proteolyse fort. Bei langem Stehen beobachtet man zunehmendes Auskrystallisieren einfacher Aminosäuren und Hand in Hand Abnahme der beim Verdünnen mit Aceton ausfallenden, koagulierenden Eiweißkörper. Solche gealterte Invertinlösungen zeigten das günstigste Verhalten bei der Reinigung nach der Adsorptionsmethode, so daß wir daraus allein durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution mit Ammoniak Invertin vom Minutenwert 1 erhielten.

Noch wichtiger ist ein im voranstehenden noch nicht erwähnter anderer Begleitstoff, über dessen Bedeutung für das Invertin die Ansichten am weitesten auseinandergehen, der Hefegummi. H. v. EULER und O. SVANBERG, die in der Darstellung von Invertin hohen Reinheitsgrades am erfolgreichsten waren, kamen vor kurzem bei der Reinigung von Invertin durch Dialyse und bei seiner Analyse zu dem Resultat [1], daß sich die von EULER und A. FODOR [2] früher geäußerte Hypothese von der chemischen Verwandtschaft zwischen Saccharase und Hefegummi auch heute aufrecht erhalten lasse. Auch bei unserem Verfahren der Reinigung mit Aluminiumhydroxyd (Kapitel B, III und C, II) folgt der Hefegummi **[50]** stets dem Invertin. Und die letzten Invertinpräparate von H. v. EULER und O. SVANBERG[1]) enthalten so viel Hefegummi, daß sie bei der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure 75 bis 92% Monose liefern.

Entgegengesetzt war das Ergebnis der Untersuchungen von E. SALKOWSKI[2]) über den Hefegummi und das Invertin der Hefe. Er fand, „daß es unter Umständen gelingt, stark wirksame Invertinlösungen zu erhalten, in denen sich auch nach starkem Eindampfen Gummi nicht nachweisen läßt". Dieser Satz wird im Kapitel C unserer Arbeit durch die Reinigung des Invertins mit Kaolin bestätigt.

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 175 [1920].
[2] Zeitschr. f. Physiol. Chem. **72**, 339 [1911].
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 175, 185 [1920]; O. SVANBERG Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65, 86 [1920].
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 124 [1909]; s. auch K. OSHIMA. Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 42 [1902], und dagegen B. HAFNER, Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**, 1 [1904].

Beim Ausziehen der Hefe mit Chloroformwasser von möglichst 0° konnte E. SALKOWSKI gummiarme oder sogar gummifreie Lösungen darstellen, die Invertin enthielten. Freilich sind solche Invertinlösungen sehr schwach, und sie enthalten nach unseren quantitativen Bestimmungen (Abschnitt IV, 2) höchstens ein paar Prozent vom Invertin der Hefe.

Die Methode von SALKOWSKI, gummiarme Hefeauszüge darzustellen und auf Invertin zu verarbeiten, läßt sich, wie auch SALKOWSKI selbst gefunden hat, schwer in einen präparativen Maßstab übertragen. Aber die quantitative Prüfung von Invertinlösungen, die unter Anwendung verschiedener Zellgifte erhalten wurden, bestätigt, daß große Differenzen im Hefegummigehalt vorkommen, und sie lehrt, daß es sich dabei nicht um einen einfachen Lösungsvorgang handelt. Wahrscheinlich wird der Hefegummi nach der Abtötung der Hefe durch einen gewissen enzymatischen Vorgang erst freigelegt, der andere Bedingungen erfordert als der enzymatische Eiweißabbau und der unter ähnlichen Bedingungen wie die Invertinauflösung günstig verläuft. Außerdem wäre es [51] auch möglich, daß der Hefegummi unter bestimmten Bedingungen der Wasserstoffionenkonzentration durch enzymatische Hydrolyse aus dem Extrakt verschwände.

Die Auflösung des Gummis aus der Hefe ist bei der raschen Autolyse unter Anwendung von Chloroform gehemmt, dagegen verläuft sie gut bei der raschen Autolyse nach HUDSON mit Toluol. Es dürfte sich hier so wenig wie bei dem Lösungsprozeß des Invertins um eine spezifische Wirkung des Chloroforms handeln, sondern eher darum, daß das Auftreten des Hefegummis in der Autolyse eine bestimmte Reaktion des Mediums, und zwar in der Hefezelle zur Voraussetzung hat. Als wir nämlich die Invertindarstellung durch die rasche Autolyse bei Gegenwart von Chloroform wiederholten, aber unter Zusatz von Ammoniumphosphat, wurde der Gehalt an Hefegummi sehr groß. Und er war gleichfalls besonders groß bei der Invertingewinnung mit Toluol—Essigester—Ammoniumphosphat.

Zur Bestimmung des Hefegummis wandten wir die Methode der quantitativen Bestimmung mit Fehlingscher Lösung nach E. SALKOWSKI[1] an. Sie liefert uns keine genauen, aber der Größenordnung nach zuverlässige Werte, während wir die qualitative Prüfung mit Kupfersulfat, Ammoniak und Natronlauge nach E. SALKOWSKI[2] bei den Hefeextrakten nicht mit Sicherheit anzuwenden vermochten. In reineren Hefegummilösungen war diese Prüfung mit dem Reagens von SALKOWSKI noch in Verdünnungen von 1:5000 zuverlässig, wenn das Ammoniak vorsichtig bemessen wurde. Man muß genug Ammoniak anwenden, um das Kupfer in Lösung zu bringen und zu halten, aber Überschuß von Ammoniak vermeiden, da darin die Hefegummi-Kupfer-Verbindung auch bei Gegenwart von Natronlauge löslich ist.

Für die vergleichenden Bestimmungen des Hefegummis stellten wir in den Versuchen 1 bis 4 der Tab. 18 aus der nämlichen Hefeprobe durch dreitägige Autolyse

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 124, 127 [1909].
[2] Ber. d. d. chem. Ges. **27**, 497 [1894].

Extrakte dar; $2^1/_2$ kg frischer Hefe wurden mit gleichem [52] Gewicht Wasser und z. B. mit 62 g Diammoniumphosphat und je 250 ccm Essigester und Toluol angesetzt. Die Bedingungen für die Vergleichsversuche waren ähnlich; für die Autolyse bei Gegenwart von Chloroform dienten 50 ccm von diesem auf 300 g Hefe mit 300 ccm Wasser. Nur diese mit Chloroform dargestellten Hefeauszuge wirkten auf Fehlingsche Lösung unmittelbar beträchtlich reduzierend, enthielten also reduzierenden Zucker.

Die Gummibestimmungen wurden mit je 50 ccm der nicht gereinigten Filtrate durch Fällen mit 30 ccm Fehlingscher Lösung und weitere Behandlung des Niederschlages nach SALKOWSKI ausgeführt, und die gefundenen Hefegummimengen (Tab. 18) auf 1 kg trockene Hefe umgerechnet. Die mit Chloroform dargestellte Invertinlösung enthielt 40mal weniger Hefegummi als die Lösung aus der Autolyse mit Essigester, Toluol und Ammoniumphosphat, während sich die Invertinmengen wie 1 : 3,3 verhielten. Der Gummigehalt der zuletzt angeführten Invertinlösung entsprach der von E. SALKOWSKI bestimmten Gesamtmenge in der Hefe (6,9 %).

Tabelle 18. Gehalt verschiedener Invertinlosungen an Hefegummi.

Nr.	Darstellung der Invertinlösung	Zeitwert der Invertinlösung auf Hefe bez.	Gehalt an Hefegummi in 50 ccm	Hefegummi (g) in der Autolysenflüssigkeit aus 1 kg Trockenhefe
1.	Hefe mit Essigester + Toluol und Ammonphosphat	[illegible]	0,429	70
2.	Hefe mit Toluol	380	0,247	40
3.	Hefe mit Essigester und Ammonphosphat	650	0,153	26
4.	Hefe mit Chloroform	1000	0,011	1,8
5.	Hefe mit Chloroform und Diammonphosphat gab mit Fehlingscher Losung einen starken Hefegumminiederschlag.			

[53] IX. Darstellung von Invertinlosungen.

Aus den zahlreichen Varianten der raschen Autolyse ergeben sich fur die praktische Anwendung folgende Verfahren:

1. Verfahren von HUDSON (rasche Autolyse bei Anwendung von Toluol).

Die frische Preßhefe wird in das gleiche bis doppelte Gewicht Wasser eingetragen, mit 5 bis 10 % ihres Gewichtes an Toluol vermischt und nach kräftigem Durchschütteln, das man alle Tage wiederholt, bei Zimmertemperatur 4 bis 7 Tage der Autolyse überlassen. Nach wenigen Stunden setzt unter beträchtlicher Gasentwicklung Selbstgarung ein, die bis zum folgenden Tage beendet ist. Nach einer Woche filtrieren wir die Hefeflüssigkeit auf einer Reihe von Faltenfiltern ab. Es ist nicht ratsam, ein Filter mehr als einmal nachzufüllen. Der abfiltrierte Auszug beträgt etwa 1400 ccm für 1 kg 20- bis 22proz. Frischhefe (oder bei Anwendung von 2 Teilen Wasser 2100 ccm), d. i. ungefähr 80 % der entstandenen Hefeflüssigkeit, und sein Trockengewicht 85 bis 123 g. Der darauf bezogene Zeitwert war 160 bis 206 bei Anwendung unserer Brauereihefen vom Minutenwert 230 bis 350.

HUDSON befreite die Invertinlösung mit Bleiacetat von Eiweißkörpern und unterwarf sie nach der Beseitigung des überschüssigen Bleies mit Schwefelwasserstoff der

Dialyse, und zwar sofort, da sonst die aus dem überschüssigen Bleizucker stammende Essigsäure zerstörend wirkte. Es ist zweckmäßig, einen größeren Bleiüberschuß zu vermeiden, indem man Tüpfelproben in Schwefelammonium macht. Wenn die Flüssigkeit schon ein wenig Blei enthält, gibt sie zwar noch etwas mehr Fällung mit weiterem Bleiacetat, erfordert aber nur noch wenig davon. Der Eiweißniederschlag ist reichlich und gut filtrierbar. Das Filtrat gibt mit Schwefelwasserstoff nur ein wenig kolloides Bleisulfid, [54] das mit spanischer Klärerde koaguliert und abfiltriert wird. Die hellgelbe Invertinlösung ist schon ohne Dialyse haltbar.

2. Verfahren der raschen Autolyse mit Essigester + Toluol (oder Toluol allein) unter Neutralisieren mit Ammoniak oder Ammonphosphat.

Das Verfahren hat den Vorzug günstigerer Invertinausbeute und etwas größerer Reinheitsgrade. Die Frischhefe wird nach dem Eintragen in das gleiche (oder doppelte) Gewicht Wasser durch Versetzen mit Toluol und Essigsäureester (je 50 ccm auf 1 kg) verflüssigt. Man beginnt bald die auftretende Säure mit verdünntem Ammoniak zu neutralisieren und vervollständigt die Neutralisation in den ersten Stunden oft und weiterhin am ersten Tage noch einige Male. Die Auflösung des Invertins erfordert 3 bis 4 Tage. Um die Invertinlösung filtrierbar zu machen, muß man sie mit Essigsäure neutralisieren, wodurch ein sehr starker Eiweißniederschlag entsteht, und läßt noch eine Stunde lang stehen. Dann lassen sich ungefähr 1500 ccm (aus 1 kg Hefe mit gleichem Gewicht Wasser) abfiltrieren mit meistens größerem Invertingehalt, als derjenige der Hefe war, und mit einem Trockengewicht von 57 bis 85 g. Der Zeitwert einer solchen Invertinlösung, auf Trockenrückstand bezogen, betrug 114 bis 142. Die weitere Reinigung zeigt keinen Unterschied gegenüber dem Hudsonschen Verfahren. Durch die Fällung mit Bleiacetat verminderte sich das Trockengewicht auf 47 (in mehreren Beispielen), während sich der Zeitwert auf 70 bis 90 verbesserte.

Die Anwendung von Ammonphosphat ist bequemer und gleichmäßiger, die Autolysenflüssigkeit in diesem Falle schon ohne Behandlung mit Essigsäure besonders gut filtrierbar, der Reinheitsgrad und die Invertinausbeute pflegt noch etwas höher zu sein. Man verwendet für 1 kg Frischhefe 25 g $(NH_4)_2HPO_4$. Die filtrierte Invertinlösung wird entweder direkt mit Bleiacetat von Phosphorsäure und Proteinen befreit oder man fällt zuerst mit Magnesiumchlorid die Phosphorsäure aus und [55] enteiweißt das Filtrat mit Bleizucker, in diesem Falle mit einer viel geringeren Menge. Die Reinigungsoperationen bewirkten in einem solchen Beispiel keinen Verlust von Invertin, auch die Fällung von Magnesiumammonphosphat adsorbierte kein Enzym. Das Verhalten dieser Neutralextrakte war aber bei verschiedenen Darstellungen merkwürdig ungleich.

3. Invertinlösung aus Trockenhefe.

Da die frische Hefe von Lieferung zu Lieferung Unterschiede im Verhalten und im Invertingehalt aufweist, so wird die Verarbeitung gleichmäßiger und erfordert eine geringere Zahl von Analysen, wenn die Hefe getrocknet und die einzelnen Lieferungen vermischt werden.

Die Hefe wird an der Luft ausgebreitet und langsam getrocknet. Die gemahlene Trockenhefe wird mit der 10fachen Menge Wasser und der ihr gleichen oder halben Menge Toluol vermischt und einige Zeit gerührt oder an der Maschine geschüttelt. Für die Reinheit des Invertins ist es besser, bei Zimmertemperatur die Auflösung in 2 bis 3 Tagen vor sich gehen zu lassen, als das Verfahren durch Erwärmen abzukürzen. Auch bei der entwässerten Hefe bedeutet die Neutralisation eine Verbesserung und Abkürzung und, da der größte Teil der Säure rascher als bei frischer Hefe auftritt, so ist das Neutralextraktionsverfahren hier besonders bequem. Der Zeitwert einer solchen Invertinlösung, ungünstiger als bei der Autolyse von Frischhefe, war 260.

B. Über die Adsorption des Invertins und Elution aus dem Adsorbat.

I. Theoretischer Teil.

Es war beabsichtigt, das Invertin durch abwechselnde Adsorption mit elektropositiven und elektronegativen Adsorbentien auf höhere Reinheitsgrade zu bringen. Die präparative Anwendung der Adsorptionsmethode ist [56] durch die Untersuchungen von L. MICHAELIS wesentlich gefördert worden. In der ersten Arbeit von L. MICHAELIS[1] über „Die Adsorptionsaffinitäten des Hefeinvertins" wurde dieses als ein entschieden elektronegatives Kolloid gekennzeichnet. Es ließ sich nicht adsorbieren durch elektronegative Adsorbentien, Kaolin, Mastix, Arsensulfid, dagegen vollständig durch Eisen- und Aluminiumhydroxyd. Diese Angaben vervollständigten L. MICHAELIS und M. EHRENREICH[2] in ihrer Abhandlung über „Die Adsorptionsanalyse der Fermente". Sie wählten solche Adsorbentien, „bei denen eine mechanische Adsorption nicht in Frage kommt", nämlich solche, die „unter allen Bedingungen entschiedene und einsinnige Ladungen tragen", wie Kaolin, Tonerde und Eisenhydroxyd. Dabei wurde festgestellt, daß alle Substanzen, die durch Kaolin adsorbiert werden können, Basen sein müssen, alle Substanzen, die durch Tonerde adsorbiert werden können, Säuren sein müssen. Daraus folgerten MICHAELIS und EHRENREICH: „Auf Grund dieses Leitsatzes sind wir aber in die Lage gesetzt, mit Leichtigkeit die elektrochemische Natur der von uns geprüften Fermente festzustellen. Invertin wird bei allen Reaktionen von Tonerde adsorbiert, bei keiner Reaktion von Kaolin, hat also den Charakter einer Säure."

Gegenüber diesen wegleitenden Betrachtungen ist zu berücksichtigen, daß die Enzyme nicht als reine Stoffe vorliegen. Man findet sie in den aus tierischen oder pflanzlichen Organen oder aus Pilzen gewonnenen Auszügen mit einem großen Vielfachen komplizierter organischer Verbindungen vergesellschaftet, nicht einfach im Zustand eines Gemisches, sondern durch Kräfte verbunden, wie sie auch in den Adsorptionsverbindungen mit unlöslichen Adsorbentien wirken. Auch wenn wir den relativen Gehalt der Hefeauszüge gegenüber denjenigen, mit welchen frühere Adsorptionsversuche ausgeführt wurden, der [57] Größenordnung nach steigern, so überwiegt

[1] Biochem. Zeitschr. 7, 488 [1907/08]. [2] Biochem. Zeitschr. 10, 283 [1908].

dennoch nicht das Invertin, sondern die Masse der Begleitstoffe. Sie sind in ihrer Zusammensetzung durchaus nicht konstant, sondern, wie im Kapitel A gezeigt wurde, kann man die Autolyse des Pilzprotoplasmas verschieden leiten, so daß die Natur der amphoteren Stoffe aus der Klasse der Proteine und der Proteinabbauprodukte ungemein schwankt. Davon ist das Verhalten gegen Adsorbentien und im Adsorbate abhängig.

Daher sagt die Adsorptionsanalyse oder die elektrische Überführung über die Natur eines Fermentes nichts aus, sondern sie läßt nur erkennen, ob in dem aus einem Ferment und seinen jeweiligen Begleitstoffen gebildeten Additions- oder Adsorptionsprodukt die Säure- oder Basennatur überwiegt. Dabei hängt es von schwer bestimmbaren Versuchsbedingungen ab, daß das Enzym in die eine oder andere Assoziation mit Begleitstoffen, in eine elektropositive oder eine elektronegative gelangt.

Ein Beispiel aus dem nachstehenden Kapitel für diese Betrachtung ist das Verhalten des Invertins gegen Kaolin. Wenn das Enzym durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution aus dem Adsorbat von einem bedeutenden Teil des Ballastes befreit worden ist, so wird es aus der wäßrigen Lösung quantitativ durch Kaolin adsorbiert. Daraus ergibt sich, daß Invertin nicht elektronegativ, sondern amphoter ist, aber auch diese Folgerung gilt zwar für reinere, indessen gewiß noch unreine Präparate.

Noch mehr wie das Adsorptionsverhalten wird die Beständigkeit der Adsorbate durch die Begleiter bestimmt. Dieser Einfluß macht sich bei dem für die präparative Anwendung wichtigen Versuche geltend, die Adsorptionsverbindung eines Enzyms zu lösen. Dafür fehlte es bisher an Angaben und Methoden.

Für das Invertin sind in dieser Hinsicht nur zwei Versuche von H. v. Euler und S. Kullberg[1] und [58] H. v. Euler und O. Svanberg[2]) veröffentlicht worden. Im ersten Falle diente kolloide Eisenlösung zur Adsorption. Die Fällung behandelten Euler und Kullberg mit 0,05 proz. Salzsäure, und sie fanden in der entstandenen sauren Lösung die Wirksamkeit des Invertins gesteigert, aber die Ausbeute gering. Ebenfalls durch Auflösen in 0,1 n-Salzsäure untersuchten Euler und Svanberg das in ihrem neueren Versuche dargestellte Adsorbat von Invertin mit in der Kälte gefälltem Aluminiumhydroxyd. Dieses Adsorbens zeigte nach Euler und Svanberg „kein selektives Adsorptionsvermögen, weder gegen die Saccharase noch gegen die inaktiven Begleitsubstanzen derselben".

Die Methode der Enzymadsorption und Zerlegung des Adsorbates ist am Beispiel der Peroxydase[3]) weiterentwickelt worden, das uns für die Versuche mit Invertin als Vorbild diente. Für die Bindung und Entbindung des Enzyms bedeutete es eine Verbesserung[4]), zwei verschiedene Lösungsmittel anzuwenden, um „die Verteilung der Peroxydase zwischen Lösungsmittel und Adsorbens zugunsten des letzteren bei der Adsorption, im entgegengesetzten Sinne bei der Umkehrung des Vorganges, der Elution, zu beeinflussen". Auch die Adsorption des Invertins wird vervollkommnet,

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 335 [1911].
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 260, 290 [1919].
[3]) R. Willstätter, diese Annalen **422**, 47 [1921].
[4]) a. a. O., S. 61.

indem man statt wäßriger Lösungen wäßrig-acetonige anwendet. Mit dreimal weniger Adsorbens entstehen Adsorbate, in denen das Verhältnis von Invertin zum Trockenrückstand dreimal günstiger ist als bei der Adsorption aus wäßriger Lösung.

Ein weiterer Fortschritt bestand in der fraktionierten Adsorption der Peroxydase, die auf zwei Wegen gelang. Es war nicht nur möglich, das Enzym auf höhere Konzentration zu bringen, indem man es unter Hinterlassung von Begleitstoffen durch Aluminiumhydroxyd adsorbierte, das Verfahren ließ sich gleichfalls mit Tonerde auch so [59] leiten, daß überwiegend die begleitenden Stoffe adsorbiert und aus der Restlösung das nicht adsorbierte Enzym in hohem Reinheitsgrad wiedergewonnen wurde.

Die Zerlegung des Peroxydaseadsorbates ist mit sehr schwacher Säure glatt erzielt worden, am besten mit kohlensäurehaltigem Wasser. Auch die Invertinadsorbate, und zwar ebensogut in elektronegativen wie elektropositiven Adsorbentien, vermögen wir in vielen Fällen mit einfachen chemischen Mitteln zu zerlegen, und zwar mit sehr verdünnten Alkalien, namentlich Ammoniak (von 0,01 bis 0,1 %) oder mit sekundären Alkaliphosphaten. Ammoniak bewirkt in besonders geeigneten Fällen die Elution, sekundäres Phosphat in allen untersuchten. Die Elution beruht auf der Überwindung der kleinen Affinitätsbeträge, die in den Adsorbaten wirken, durch etwas stärkere Affinitäten. Die Rolle der Eluentien wird erst dann genauer zu erklären sein, wenn man das Verhalten des Enzyms in verschiedenen, namentlich in noch höheren Reinheitsgraden kennt.

Das bemerkenswerteste unter den verschiedenen Eluentien ist Rohrzucker, mit dem wir das Invertin leicht und quantitativ aus dem Aluminiumhydroxyd freilegen können, während er das Invertin aus der Hefezelle nicht zu eluieren vermag.

Die Elutionserscheinungen gewähren tieferen Einblick in die Zusammensetzung der Enzymadsorbate. Die Zusammensetzung und demzufolge das Verhalten der Adsorbate ist nämlich von den Bedingungen ihrer Bildung abhängig. Wenn das Invertin aus dem wäßrigen Hefeauszug bei Gegenwart von Ammoniak adsorbiert wird, was quantitativ gelingt, so verhält sich das Adsorbat anders als nach der Darstellung aus ammoniakfreier, am besten acetonhaltiger Lösung. Das Invertin ist im ersteren Falle aus dem Adsorbat gar nicht durch Ammoniak eluierbar. Dem Adsorbat fehlen entweder Stoffe, die beim Eluieren mitwirken, oder es enthält zusammen mit dem Invertin Stoffe, die es fester an das [60] Aluminiumhydroxyd binden. Es zeigt sich, daß Stoffe beider Art in den Adsorbaten vorkommen. Manche Tonerdeadsorbate enthalten Begleitstoffe, deren Beseitigung das Eluieren des Invertins verhindert; andere enthalten Begleitstoffe, durch deren Beseitigung die Elution des Invertins erst ermöglicht wird. Ein Verfahren, solche Begleitstoffe aus den Hefeauszügen zu entfernen, ist ihre Vorbehandlung mit Bleiacetat. Nach dieser Reinigung fehlt der durch rasche Autolyse gewonnenen Invertinlösung ein Stoff, der das Eluieren aus dem Adsorbat durch Ammoniak ermöglicht. Hingegen liefern nur nach dieser Reinigung die durch Neutralextraktion gewonnenen Hefeauszüge Adsorbate, die mit Ammoniak eluierbar sind.

*Diese Begleitstoffe, deren Einfluß im folgenden genauer beschrieben wird, sollen als „Koadsorbentien" und „Koeluentien" unterschieden werden. Es ist wahr*scheinlich, daß das Adsorbendum an das Adsorbens sowohl unmittelbar gebunden, wie auch durch die Vermittlung eines Koadsorbens gebunden auftritt, und daß es ferner mit solchen Begleitstoffen assoziiert sein kann, an denen das Ammoniak beim Eluieren angreift, und daß diese auch fehlen können. Fehlen die Koadsorbentien, so ist das Enzym lockerer gebunden, und das Eluieren kann auch ohne Koeluentien erfolgen. Auch die Koadsorbentien differieren in Zusammensetzung und Verhalten. Denn in den Produkten der raschen Autolyse sind sie nicht durch Bleiacetat fällbar, hingegen sind sie fällbar in den bei neutraler Reaktion gebildeten Hefeauszügen.

Mit den folgenden Formeln der Adsorbate suchen wir für diese Beobachtungen einen einfachen Ausdruck aufzustellen:

Koadsorbens ··· Adsorbens

I. Enzym

Koeluens
(eluierbar durch Ammoniak)

II.
Enzym ··· Koadsorbens ··· Adsorbens
(nicht eluierbar durch Ammoniak)

III.
Enzym ··· Adsorbens
(eluierbar durch Ammoniak)

[61] II. Verhalten des Invertins in den Hefeauszügen gegen Kaolin.

Nachdem L. Michaelis[1] beobachtet hatte, daß Invertin von Kaolin nicht adsorbiert werde, fanden H. v. Euler und S. Kullberg[2] zur Darstellung wirksamer Invertinpräparate „eine Kombination der Enteiweißung mit Bleiacetat und mit Kaolin" geeignet.

Unsere Versuche ergaben, daß auch in den durch rasche Autolyse nach Hudson entstehenden Invertinlösungen das Enzym selbst von viel Kaolin nicht adsorbiert wird. Diese Bestätigung war nicht nur wegen der nützlichen Anwendung von Kaolin allein für eine erste Reinigung der Invertinlösung von Interesse, sie war auch für den Vergleich des Verhaltens von unreinem und reinem Invertin von Wichtigkeit.

Diese erste Behandlung mit Kaolin ist daher ohne Verlust von Invertin möglich. Aber sie ist ungenügend. Denn wenn mit dieser Eiweißbeseitigung (Behandlung mit 10% Kaolin über Nacht) und dann weiter durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution und Adsorption mit Kaolin und Elution Invertin gereinigt wurde, so schleppte das Enzym sogar bei einem Zeitwert von 0,86 noch immer viel Eiweiß mit. Es zeigte in 0,3proz. Lösung noch deutliche Biuretreaktion, kräftige Millonsche Reaktion und gab eine Fällung mit Ferrocyankalium und Essigsäure. Dagegen verschwand dieser hartnäckige Begleiter, wenn die Eiweißadsorption durch Kaolin in wäßrig-acetoniger Lösung vorgenommen wurde. Die Anwendung eines schlechteren Lösungsmittels für die Eiweißkörper befördert eben ihre Adsorption

[1] Biochem. Zeitschr. 7. 488 [1907/08].
[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. 73. 335. und zwar S. 338 [1911].

durch das Kaolin, das der Invertinlösung ein *Vielfaches von Begleitstoffen entzieht, wenn sie mit Aceton mäßig verdünnt ist.*

Ein nach HUDSON *dargestellter Hefeauszug wurde a) mit 12% seines Gewichtes an Kaolin geschüttelt;* [62] das Kaolin nahm 0,7% vom Trockengewicht der Invertinlösung auf. In b) und c) wurde dieser Extrakt mit 40% seines Volumens an Aceton vermischt und mit 12% Kaolin geschüttelt. Das Kaolin entzog nun der Invertinlösung b) 8,2 und c) 6,2% ihres Trockenrückstandes.

Daher mußte auch die Vorfrage entschieden werden, ob auch unter diesen Umständen Kaolin kein Invertin mit entfernt. Es zeigte sich, daß gewöhnlich in acetonhaltiger Lösung Kaolin einen kleinen Teil des Invertins adsorbiert, mitunter gar nichts, aus manchen Hefeauszügen aber ziemlich viel.

Den ersten Versuch mit Invertin in wäßriger Lösung führten wir mit Autolysenflüssigkeit aus, ehe sie von den Heferückständen abfiltriert war. Nach Behandeln mit 10% ihres Gewichtes an Kaolin saugten wir durch ein Pukallsches Tonfilter ab (Anh. Nr. 96 A).

Nulldrehungszeit der Hefeflüssigkeit 39,8,
„ nach Filtrieren von Kaolin . . . . 40,6.

Für den zweiten Versuch diente eine andere, von der Hefe abfiltrierte Invertinlösung, die wir mit 12% Kaolin behandelten (Anh. 96 B).

Nulldrehungszeit der Invertinlösung 53,
„ nach Behandeln mit Kaolin . . . . 53.

Im dritten Versuch wurde ein Hefeauszug sogar mit dem gleichen Gewicht Kaolin bearbeitet (300 ccm mit 300 g); da der Zeitwert sich dabei etwas verbesserte, scheint das Kaolin der Lösung Wasser entzogen zu haben (Anh. 97).

Nulldrehungszeit der Lösung 87,5,
„ nach Behandeln mit Kaolin . . . . 80.

Hinsichtlich der Einwirkung von Kaolin auf die wäßrig-acetonige Lösung des Invertins liegt in vielen Versuchen, in denen diese Behandlung der Adsorption mit Tonerde vorangeht, die Erfahrung vor, daß kein oder fast kein Verlust eintrat. In einem besonderen [63] Versuch wurden 100 ccm Hefeauszug mit 40 ccm Aceton und 12 g Kaolin behandelt und nach dem Abfiltrieren durch Eindampfen im Vakuum vom Aceton befreit. Der Menge-Zeit-Quotient vor dem Versuche war 0,50, am Ende 0,50. Für das davon abweichende Verhalten liegen Bestimmungen vor, die direkt mit dem acetonhaltigen Filtrat vom Kaolin ausgeführt sind, und zwar mit 10 ccm, die man mit der Zuckerlösung auf 100 ccm brachte. Das Aceton bewirkte bei einem so niedrigen Prozentgehalt in der Bestimmungsflüssigkeit keine beträchtliche Hemmung der Invertinwirkung. In allen Fällen ließen wir das Kaolin, und zwar 10% vom Gewicht des acetonfreien Extraktes, über Nacht auf die mit 40% ihres Volumens Aceton verdünnte Invertinlösung einwirken.

1. Versuch. Drei Proben des nämlichen Hefeauszuges ergaben Rückgang des M.Z.Q. von 6,20 auf 5,45, 5,10, 5,23, also Invertinverluste von 12, 18, 15,5%. Die Werte sind Maximalwerte, sie können bis zu 6% zu hoch sein (Anh. Nr. 98).

2. Versuch. Zwei Proben eines anderen Extraktes ergaben Abnahme der M.Z.Q. von 8,70 auf 6,50 und 7,47, also Invertinverluste von 25,5 und 14% (Anh. Nr. 99).

3. und 4. Versuch. Bei zwei weiteren Extrakten gingen die M.Z.Q. von 0,499 auf 0,455 und von 0,525 auf 0,462 zurück; also Invertinverluste von 7 und 12% (Anh. Nr. 100 und 101).

5. Versuch. Ein anderer Hefeauszug erlitt unter denselben Bedingungen Rückgang des M.Z.Q. von 4,85 auf 3,06, also Invertinverlust von 37% (Anh. Nr. 102).

Das Verhalten der Autolysenflüssigkeiten ist nicht konstant. In einer derselben (1 Teil Hefe, 2 Teile Wasser; Februar 1920) war das Invertin durch Kaolin so reichlich adsorbierbar, daß dieses aus der 28% Aceton enthaltenden Flüssigkeit, nach 20 Stunden abgetrennt, 33,2% des Invertins enthielt; davon gehen etwa [64] 4% für den Invertingehalt der im Kaolin enthaltenen Waschflüssigkeit ab. M.Z.Q. des angewandten Extraktes war nämlich 0,65, der des Kaolins 0,22 (Anh. Nr. 103).

III. Adsorption des Invertins durch Aluminiumhydroxyd.

1. Beständigkeit des Invertins in Acetonlösung.

Die Anwendung acetonig-wäßriger Lösung ist nach der Reinigung des Invertins mit Kaolin auch für die Adsorption mit Aluminiumhydroxyd vorteilhaft. Die aufeinander folgende Behandlung mit Kaolin und Aluminiumhydroxyd erforderte bei großen Mengen so viel Zeit, daß eine Schädigung durch das organische Solvens zu befürchten war. Das Aceton übt ähnlich wie Alkohol auf das Invertin außer der Hemmung auch zerstörende Wirkung aus, die in Kapitel C genauer beschrieben wird. Diese Schädigung des Enzyms ist von seinem Reinheitsgrad ungemein abhängig. Glücklicherweise ist das Invertin durch seine Begleitstoffe in den Hefeauszügen genügend geschützt, so daß es in 28% Aceton enthaltender Lösung dieses geringen Reinheitsgrades während mehrerer Tage nicht erheblich leidet.

Tabelle 10. Beständigkeit des Invertins in 28% Aceton enthaltenden Hefeauszügen.

	Hefeauszug					
	I (Anh. 104)	II (Anh. 105)	III (Anh. 106)	IV (Anh. 107)	V (Anh. 108)	VI (Anh. 109)
Nulldrehungszeit bei Versuchsbeginn	278	654	285	476	280	100
„ nach 2 Tagen	278		301	415	236	92
„ „ 3 „	262	660	310	384	261	
„ „ 7 „	268	660	340	402	258	

[65] Viel empfindlicher ist das Invertin schon in dem Reinheitsgrad, den es durch einmalige Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution mit Ammoniak erreicht. Für die so erhaltenen Invertinlösungen war ein organisches Fällungsmittel nötig. Aber hier läßt sich die Einwirkungszeit auf einige Minuten abkürzen, da das Invertin aus der eingeengten wäßrigen Flüssigkeit nur bei 0° mit Aceton gefällt und in der Zentrifuge rasch abgetrennt zu werden braucht.

Überraschend war die völlige Zerstörung des Invertins durch Aceton bei Gegenwart von Ammoniak oder Ammoniumsalzen. Ein unter Neutralisation mit Ammoniak dargestellter, mit Essigsäure schwach angesäuerter Hefeauszug änderte seine Wirksamkeit 2 Monate gar nicht, verlor aber nach Versetzen mit 40% Aceton in 3 Tagen

88% der Invertinwirkung (Anh. Nr. 110). In einer zweiten Probe der Invertinlösung betrug der Rückgang nach Zufügen des Acetons sogar in einer Stunde 43, in 24 Stunden 93% (Anh. Nr. 111). Natürlich verhalten sich ebenso anders dargestellte Aceton enthaltende Hefeauszüge, sobald sie mit etwas Ammonacetat versetzt wurden; wir beobachteten z. B. in 24 Stunden Abnahme um 83% (Anh. Nr. 112). Dagegen war Ammoniumphosphat (die in einem mit diesem Puffer dargestellten Auszug enthaltene Menge) zusammen mit Aceton 24 Stunden lang unschädlich (Anh. Nr. 113). Besonders energisch ist die Wirkung des Ammoniaks bei Gegenwart von Magnesiumsalzen. Wir versetzten die Hefeauszüge mit Magnesiumacetat oder Magnesiumchlorid und Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion; die Invertinwirkung blieb konstant. Als aber 40% des Volumens an Aceton zugefügt wurde, trat in wenigen Stunden quantitative Zerstörung des Invertins ein.

Die Erklärung für diese Erscheinung liegt in der Bildung von Diacetonamin bei der Einwirkung des Ammoniaks auf Aceton, besonders, wie es sich zeigt, bei Gegenwart von Magnesiumsalz. Das Amin übt auf [66] das Enzym eine Giftwirkung aus, die als eine einfache chemische Reaktion des Invertins mit der Aminogruppe der Base zu verstehen ist, ähnlich wie die von H. v. Euler und O. Svanberg[1] vor kurzem beschriebenen Giftwirkungen, z. B. von Anilin und Anilinderivaten.

2. Selektive Adsorption.

Es ist eine Erfahrung aus dieser Arbeit, daß eine bestimmte Sorte Aluminiumhydroxyd unter verschiedenen Bedingungen, z. B. in wäßriger oder acetonig-wäßriger Lösung ungefähr gleiche Stoffmengen, aber verschiedene Mengen Enzym adsorbiert. Daher wird das Invertin, je weniger Aluminiumhydroxyd man braucht, um eine gegebene Menge desselben zu adsorbieren, in desto reinerem Zustande dadurch erhalten. Die zur Adsorption des Invertins erforderliche Menge von Aluminiumhydroxyd ist ein gewisses Maß seiner Selektivität. Wenn z. B. für eine mit 40 Vol.-% Aceton vermischte Invertinlösung 3 mal weniger Aluminiumhydroxyd zur quantitativen Adsorption des Enzyms nötig war wie in der wäßrigen Lösung, so war auch das adsorbierte Trockengewicht für die gegebene Invertinmenge im ersten Falle ungefähr 3 mal geringer.

Das Adsorptionsvermögen nicht nur verschiedener Adsorbentien, auch verschiedener Darstellungen von Aluminiumhydroxyd differiert in weiten Grenzen, und das Adsorptionsvermögen eines bestimmten Adsorbenspräparates differiert je nach den Bedingungen seiner Anwendung. Das Adsorptionsvermögen der Tonerde oder eines anderen Adsorptionsmittels für Invertin drücken wir mit einem Maße aus, das „Adsorptionswert“ für bestimmte Bedingungen der Adsorption heißen soll; es läßt sich natürlich mutatis mutandis auf die Adsorption anderer Enzyme übertragen. Als „Adsorptionswert“ bezeichnen wir die Menge Rohrzucker in Gramm, die in 16proz. Lösung, enthaltend 1% NaH_2PO_4, von 1 g [67] unter bestimmten Bedingungen mit Invertin gesättigtem Adsorbens bei 15,5° in 1 Minute zur 0-Drehung invertiert wird.

[1] Fermentforschung 4, 29 [1920].

Beispiele. Von der mit Invertin gesättigten Aluminiumhydroxydsuspension ließen wir 2,5 ccm, enthaltend 0,0638 g $Al(OH)_3$, auf 4 g Rohrzucker unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition einwirken. Da gemäß der gefundenen Nulldrehung von 35 Minuten für 1 g Aluminiumhydroxyd $35 \cdot 0,0638$ Minuten nötig wären, um 4 g Rohrzucker zu 75,75% zu spalten, so würden in 1 Minute $\frac{4}{35 \cdot 0,0638} = 1,787$ g Zucker auf 0° invertiert.

Indirekt ergab sich der Adsorptionswert aus der Wirkungsabnahme einer Invertinlösung und der Adsorbensmenge. Von einem acetonhaltigen Hefeauszug ergaben 2,5 ccm die Nulldrehungszeit 103. Von dieser Invertinlösung erforderte 1 l 3,97 g Aluminiumhydroxyd, um 88% des Enzyms zu entfernen. Dann wären für 2,5 ccm anzuwenden $\frac{3,97 \cdot 2,5}{1000}$ g, denen die Nulldrehungszeit $\frac{103 \cdot 88}{100}$ zukam. Für 1 g $Al(OH)_3$ berechnet sich daher die Nulldrehungszeit $\frac{3,97 \cdot 2,5 \cdot 103 \cdot 88}{1000 \cdot 100}$. Der Adsorptionswert des Aluminiumhydroxyds, die von 1 g, invertingesättigt, in 1 Minute invertierte Zuckermenge, ist also $\frac{4 \cdot 1000 \cdot 100}{3,97 \cdot 2,5 \cdot 103 \cdot 88} = 4,46$ g.

Den Adsorptionswert des Aluminiumhydroxyds, das wir durch Fällung mit Ammoniak aus dem Sulfat dargestellt hatten, bestimmten wir mit einem Hefeauszug unter verschiedenen Bedingungen und fanden ihn in acetonhaltiger Lösung größer als in alkoholhaltiger und 3- bis 8mal größer als im schwach sauren oder schwach ammoniakalischen Hefeauszug ohne organisches Solvens.

		Adsorptionswert
1.	Für den sauer reagierenden Hefeauszug	0,45
2.	„ „ schwach ammoniakalischen Hefeauszug	0,39
3.	„ „ 28% Alkohol enthaltenden Hefeauszug	1,49
4.	„ „ 28% Aceton enthaltenden Hefeauszug	1,93

[68] Tabelle 20. Selektive Adsorption mit Aluminiumhydroxyd.

Bezeichnung des Hefeauszuges	a) Mit Gehalt von 28 Proz. Aceton				b) Ohne Gehalt an Aceton			
	Zur Adsorpt. erforderl. $Al(OH)_3$	Adsorptionswert des Aluminiumhydroxyds	Adsorb. Trockengew. in Proz. vom Extraktrückstand	Zeitwert der im Al.-Hydr. enthaltenen Substanz	Zur Adsorpt. erforderl. $Al(OH)_3$	Adsorptionswert des Aluminiumhydroxyds	Adsorb. Trockengew. in Proz. vom Extraktrückstand	Zeitwert der im Al.-Hydr. enthaltenen Substanz
1. Hefeauszug, mit Kaolin gereinigt,								
50 ccm bei a)	0,415	1,72	4,4	6,8	1,46	0,685	14,4	23,5
30 ccm bei b)								
2. Derselbe Auszug, 50 ccm	0,415	1,20	4,5	10	1,46	0,342	12,3	28,8
3. Anderer, ebenso gerein. Hefeauszug, 500 ccm	1,80	1,00	3,0	9,3	—	—	—	—
4. Derselbe, fast doppelt so konzentriert,								
200 ccm	1,80	1,06	5,0	11,6	—	—	—	—
5. Anderer, ebenso gerein. Auszug, 1570 ccm	10,0	3,2	10,3	10,8	—	—	—	—
6. Mit Bleiacetat gerein. Auszug,								
300 ccm bei a)								
50 ccm bei b)	1,74	4,2	8	7	0,87	1,30	31	28
7. Anderer, ebenso gereinigter Auszug,								
750 ccm bei a)								
100 ccm bei b)	6,58	3,06	14,6	12	3,20	0,82	32	27,5

[69] Genauer und vollständiger ist eine Versuchsreihe, in der Hefeauszüge nach Vorreinigung bis zur vollständigen Wegnahme des Invertins mit Aluminiumhydroxyd behandelt wurden. Aus der Menge des letzteren und den Zeitwerten der Extrakte ergaben sich die Adsorptionswerte von 0,34 bis 4,2, und aus den Trockengewichten der Lösung vor und nach der Adsorption gingen die Invertinzeitwerte 6,8 bis 28,8 für die im Aluminiumhydroxyd enthaltenen Substanzmengen hervor (Invertingehalt bezogen auf 0,05 g Trockengewicht). Man erkennt ferner aus der Tab. 20, daß für die Adsorption aus einem Hefeauszug mit Acetonzusatz der Zeitwert so viel günstiger ist, als das entfernte Trockengewicht kleiner im Vergleich zur Adsorption aus wäßrigem Medium.

Die Adsorption wurde gewöhnlich bei schwach saurer Reaktion der Invertinlösung vorgenommen; sie gelingt mit etwas mehr Adsorbens auch mit schwach ammoniakalischem Medium, aber in diesem Falle wird schon an das Waschwasser viel Invertin wieder abgegeben.

Das angewandte Aluminiumhydroxyd war aus reinem Aluminiumsulfat oder Ammonalaun dargestellt [1]. Die siedende Lösung des Aluminiumsalzes wurde in dünnem Strahl in 15 proz. Ammoniak eingetragen, das im Emailtopf durch Einleiten von Dampf erhitzt und weiter mindestens einen Tag im Kochen erhalten wurde. Wenn nach dem Auswaschen durch Dekantieren, was eine Woche zu dauern pflegt, mit Nesslers Reagens keine Färbung mehr entsteht, so bildet das Aluminiumhydroxyd eine zähe, plastische Masse und verteilt sich zum Teil kolloidal. Das Adsorbens ist dann gut brauchbar, selbst wenn es noch Spuren von SO_4-Ion enthält. Um auch diese noch zu entfernen, muß man ein zweites Mal mit [70] Ammoniak erhitzen und dies, da man nicht mehr dekantieren kann, so lange fortsetzen, bis die Flüssigkeit ammoniakfrei ist.

Wir verglichen die Adsorptionswirkung dieses Aluminiumhydroxyds, das sich in Mineralsäure auch in der Hitze nur langsam löst, mit einem in Säure leicht löslichen, schönen Präparat von E. MERCK, dem „Aluminiumhydroxyd in Teigform" und mit dem trockenen Aluminiumhydroxyd puriss. subt. derselben Fabrik. Das unter langem Kochen dargestellte Hydroxyd, das wahrscheinlich eine wasserärmere, höher molekulare Verbindung ist, besitzt $2^1/_2$- bis 3fach höheren Adsorptionswert als das „Aluminiumhydroxyd in Teigform" und 8- bis 9fachen im Vergleich zum feinen Pulver des Handels.

Auch der Reinheitsgrad des Invertins, das mit einem käuflichen Aluminiumhydroxyd adsorbiert und daraus wie sonst mit Ammoniak eluiert wurde, blieb zurück hinter dem analoger Präparate, die mit Hilfe des beschriebenen Aluminiumhydroxyds gewonnen waren.

3. Bestimmung des Invertins im Adsorbat.

Für die Peroxydase wurde vor kurzem gezeigt[1]), daß man die Wirksamkeit des Enzyms nach seiner Adsorption, z. B. durch Aluminiumhydroxyd, wie bei dem in

[1] Vgl. R. WILLSTÄTTER, diese Annalen **422**, 47, und zwar S. 72 [1920/21].
[1]) R. WILLSTÄTTER, diese Annalen **422**, 47, und zwar S. 61 [1920/21].

Wasser gelösten quantitativ bestimmen kann und daß die Purpurogallinzahl bei der Adsorption unverändert bleibt. Das Entsprechende trifft auch beim Invertin zu. Eine Invertinlösung ändert ihren Zeitwert nicht, wenn sie mit Aluminiumhydroxyd vermischt und durchgeschüttelt wird. Auch fanden wir in einer Reihe von Adsorptionsversuchen (Tab. 21) mit Aluminiumhydroxyd im Adsorbat meistens 100% vom Invertin des angewandten Hefeauszuges.

[71] Tabelle 21.

	I Hefeauszug nach HUDSON (Anh. Nr. 114)		II Hefeauszug nach HUDSON (Anh. Nr. 115)		III Hefeauszug, nach Neutralverf., mit Bleiacetat gereinigt (Anh. Nr. 116)	
M.Z.Q. des Hefeauszuges	0,714		0,321		0,465	
M.Z.Q. des Adsorbates			0,323	100%	0,470	100%
M.Z.Q. des Adsorbates aus wäßrig-acetonig. Lösung	0,714	100%	0,323	100%	0,335	72%

Daß das Invertin im Zustand der Adsorptionsverbindung noch wirksam ist, hat L. MICHAELIS[1] als erster nachgewiesen. Er schloß daraus: „Das Ferment braucht also nicht in Lösung zu sein, um seine Wirkung zu entfalten, sondern hat auch in adsorbiertem Zustande seine Wirksamkeit. Das legt die Möglichkeit besonders nahe, daß das Ferment auch in seiner scheinbaren wäßrigen Lösung nicht in wirklich gelöstem Zustande, sondern als mikroheterogene Phase im Sinne BREDIGS enthalten sein kann."

Es war wohl möglich, daß das Invertin im Adsorbat wirkt ohne gelöst zu sein, denn es wirkt auch vollkommen in der Hefezelle und scheint in ihr in einem unlöslichen Zustande enthalten zu sein. Aber es verhält sich anders im Adsorbat. Während es aus der Hefezelle vom Rohrzucker nicht herausgelöst wird, eluiert der Zucker der Bestimmungslösung das Enzym quantitativ aus dem Adsorbat. Das Invertin wirkt also gelöst bei der Prüfung des Adsorbates.

Zu der bei der Zeitwertbestimmung üblichen Rohrzuckerlösung wurden 10 ccm in Wasser suspendiertes Adsorbat gegeben, das in der Zentrifuge vom Extrakt abgetrennt und gewaschen worden war. Nach 39 Minuten [72] wurde eine Probe von der Bestimmungslösung entnommen und mit Soda sistiert. Zugleich wurde rasch der Rest der Bestimmungslösung in der Zentrifuge vom Aluminiumhydroxyd getrennt und in der klaren Flüssigkeit erst nach weiteren 51 Minuten mit Soda die Inversion unterbrochen. Die Drehung der Lösung hatte nach den 39 Minuten 9,60° betragen und in den folgenden 51 Minuten auf 2,47° abgenommen. Aus diesen beiden Proben berechnet sich aber dieselbe Nulldrehungszeit, nämlich 116 und 117 Minuten; das Enzym war mindestens am Ende des ersten Zeitabschnittes quantitativ frei in Lösung.

[1] Biochem. Zeitschr. 7. 488 [1907/08].

4. Beständigkeit des Invertins im Adsorbat.

Die Hefeauszüge zeigen in langen Zeiträumen konstante Invertinwirkung. Diese Beständigkeit des Invertins beruht auf der Schutzwirkung von Begleitstoffen. In den Adsorbaten ist das Enzym meistens weniger beständig und es ist ungleichmäßig beständig. Die Erscheinung bietet große Mannigfaltigkeit, die wesentlich darauf zurückzuführen sein dürfte, daß in den Hefeauszügen Stoffe enthalten sein können oder fehlen können, die auf das Enzym störend einwirken und ferner, daß dem Invertin in die Adsorbate hinein genügende oder ungenügende Mengen von schützend wirkenden Begleitstoffen folgen.

Für die Mehrzahl der Versuche dienten die durch rasche Autolyse bei Gegenwart von Toluol bereiteten Invertinlösungen, verdünnt mit 40% Aceton. Das Enzym wurde quantitativ vom Aluminiumhydroxyd aufgenommen, das Adsorbat quantitativ in der Zentrifuge abgetrennt, und in derselben 2- bis 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Solche Adsorbate zeigen mitunter z. B. im Versuch 1 bei mehrtägigem Stehen langsames Verderben des Invertins.

Versuch 1 (Anhang Nr. 117).	M Z Q	Invertingehalt
Adsorbat, 6 Stunden alt	1,45	
Dasselbe, 6 Tage alt	1,265	87,5%
Dasselbe, 18 Tage alt	0,825	57%

[73] Die Adsorbate waren öfters weniger haltbar in den Hefeauszügen selbst, in denen sie gebildet waren. Im Versuch 2 wurde vom Adsorbat eine Probe bald nach dem Zufügen des Adsorbens bestimmt und weitere Proben nach längerem Stehen in der vom Enzym befreiten acetonhaltigen Autolysenflüssigkeit.

Versuch 2 (Anhang Nr. 118).	M Z Q	Invertingehalt
Adsorbat, sofort nach Bildung	1,04	
Dasselbe, 4 Stunden lang im Hefeauszug	0,75	74%
Dasselbe, 4 Tage lang im Hefeauszug	0,637	63%

Die Autolysenflüssigkeit kann z. B. etwas Amin enthalten, von Carboxylase aus Aminosäure gebildet, und dieses vermag, ähnlich wie nach Euler und Svanberg Anilin, mit dem Invertin unter Zerstörung seiner enzymatischen Wirkung zu reagieren.

Den Vergleich der Beständigkeit im Hefeextrakt und nach der Abtrennung von ihm wiederholten wir mit Aluminiumhydroxydadsorbat aus dem nämlichen Hefeauszug, und zwar im Parallelversuch mit und ohne den Gehalt von 28% Aceton. Der dritte Versuch (Tab. 22) zeigt, daß das Invertin beim Aufbewahren des Adsorbates in der Mutterlauge mehr leiden kann als im isolierten Adsorbat, daß aber die Gegenwart von Aceton ohne Einfluß ist.

Tabelle 22 (Versuch 3, Anhang Nr. 115).

	Versuch mit Hefeauszug ohne Aceton		Versuch mit Hefeauszug + 40 Proz. Aceton	
	M Z.Q. des Adsorbats	Invertingehalt in Proz.	M Z.Q. des Adsorbats	Invertingehalt in Proz.
Adsorbat, sofort nach Eintragung des $Al(OH)_3$	0,323	100	0,323	100
Adsorbat, 20 Stunden im Hefeauszug	0,255	79	0,252	78
Adsorbat, abgetrennt, 20 Stunden in Wasser suspendiert	0,30	93	0,297	92

[74] Dieser Unterschied der Beständigkeit im Hefeauszug und getrennt von ihm wird aber nicht immer gefunden. Bei einer anderen auf übliche Weise dargestellten Autolysenflüssigkeit (Versuch 4) war das Adsorbat gleich haltbar in der Mutterlauge wie getrennt von ihr.

Versuch 4 (Anhang Nr 114).

	M.Z.Q.	Invertingehalt
Adsorbat, sofort nach Bildung	0,715	
Dasselbe, 24 Stunden im acetonhaltigen Extrakt	0,670	94 %
Dasselbe, 24 Stunden in Wasser suspendiert	0,657	92 %

Zur Erklärung dieser widerspruchsvollen Beobachtungen tragen besonders zwei Beispiele mit entgegengesetzten Resultaten bei, ein Fall von Unbeständigkeit und einer von Beständigkeit des Adsorbates.

Ein nach dem Verfahren der Neutralextraktion (mit Ammoniak) dargestellter Hefeauszug, acetonhaltig, lieferte ein Adsorbat (Versuch 5), das schon frisch nur 72% der Invertinwirkung des Extraktes besaß. Rasch abgetrennt und gewaschen, verlor es vom nunmehrigen Enzymgehalt bis zum nächsten Tage wieder 20 %.

Versuch 5 (Anhang Nr. 116).

	M.Z.Q.	Invertingehalt
Hefeauszug, 28 % Aceton enthaltend	3,92	
Adsorbat, sofort nach Bildung	2,81	72 %
Dasselbe, rasch isoliert, nach 24 Stunden	2,27	57,5 %

Einem anderen Adsorbat, das aus dem ersten Versuche stammte, wurde durch Eluieren mit Ammoniak ein großer Teil vom Invertin entzogen, nämlich so viel als möglich. In diesem Zustande, in dem es noch 26 % von seinem ursprünglichen Invertingehalt hatte, bewahrten wir das Adsorbat, in Wasser aufgeschlämmt, 5 Tage lang auf und fanden (Versuch 6) in dieser Zeit die Invertinwirkung konstant. Der fester gebundene Teil des Invertins war also sehr beständig.

Versuch 6 (Anhang Nr. 120).

	M.Z.Q.	Invertingehalt
Adsorbat, frisch	1,45	
Dasselbe, nach Eluieren	0,372	26 %
Dasselbe, nach 5 Tagen	0,384	26,5 %

[75] Das Verhalten des Invertins im Adsorbate ist, wie besonders die Erscheinungen beim Eluieren lehren, verschieden, je nachdem das Invertin unmittelbar oder durch Vermittlung von Koadsorbentien im Aluminiumhydroxyd verankert ist. Davon hängt auch seine Beständigkeit ab. Das Invertin kann auch in einem und demselben Adsorbate zum Teil durch Vermittlung der Koadsorbentien, zum Teil unmittelbar an das Aluminiumhydroxyd gebunden sein, teilweise beständig, teilweise leicht zersetzlich. Im Versuch 6 war nur derjenige Teil im Aluminiumhydroxyd zurückgeblieben, der durch seine Vergesellschaftung mit Begleitstoffen am festesten gebunden ist; diese schützen das Enzym, das Adsorbat ist haltbar. Im Versuch 5 hingegen lag ein Adsorbat vor, dessen Verhalten gegen Eluentien nur mit der Annahme erklärt werden kann (s. Abschn. I und IV), daß es keine oder wenig Koadsorbentien enthält. Damit steht im Einklang die auffallende Unbeständigkeit des Invertins im Aluminiumhydroxyd.

Für diese mannigfaltigen Erscheinungen wird also die Erklärung gesucht in der schützenden Wirkung der Begleitstoffe, mit denen das Invertin durch Adsorption verbunden ist. Wenn die Lösungen und Adsorbate an diesen Koadsorbentien verarmen, so wird das Invertin der Zersetzung leichter zugänglich.

5. Fraktionierte Adsorption.

Zahlreiche Versuche zielten auf fraktionierte Behandlung der Invertinlösungen mit Aluminiumhydroxyd hin, um im Adsorbat und aus ihm Enzym von möglichst hohem Reinheitsgrad zu erhalten. Der erste Anteil der erforderlichen Adsorbensmenge und die letzten Anteile nehmen meistens mit wenig Invertin viel von den Begleitstoffen auf, so daß es nahe liegt, die erste Fraktion des Adsorbates zu verwerfen und vor der letzten die Adsorption abzubrechen. Bei den Versuchen in großem Maßstab hat sich aber nur das unvollständige Adsorbieren [76] des Invertins, z. B. von 85 bis 90%, bewährt, während für die Entfernung der leichtest adsorbierbaren Nebenprodukte die Vorbehandlung mit Kaolin in acetonhaltiger Lösung gleichmäßiger ausführbar war und mindestens ebenso günstig wirkte. Um z. B. nur 9/10 der zur Adsorption nötigen Menge Aluminiumhydroxyd anzuwenden, versuchten wir anfangs, diese vor der Verarbeitung großer Extraktmengen in kleinem Maßstab auszuprobieren. Aber die im kleinen gefundenen Zahlen ließen sich nicht auf die großen Mengen übertragen. Bei Versuchen in großem Maßstab stimmten die im kleinen für die Totaladsorption ausprobierten Mengen Adsorbens nicht und noch weniger der für eine Teiladsorption ermittelte Anteil dieser Menge. Beispielsweise war für einen mit Kaolin vorbehandelten acetonhaltigen Hefeauszug mit 100 ccm-Proben ermittelt worden, daß 16% von dem im ganzen nötigen Adsorbens nur 3% vom Invertin aufnehmen. Bei der Wiederholung mit 2 l nahmen aber 10% Adsorbens nicht weniger als 42% des Invertins auf (Anh. Nr. 121), und in einem Versuch mit 4 l adsorbierten 20% der ausprobierten Adsorbensmenge 53% vom Invertin (Anh. Nr. 122). Daraus zogen wir die Lehre, in der präparativen Arbeit, wenn z. B. 15 bis 30 l Hefeauszug in 6 bis 12 Anteilen verarbeitet wurden, zunächst in einer ganzen $2^1/_2$ l-Portion zu bestimmen, wieviel Aluminiumhydroxyd zur Gesamtadsorption nötig war, um davon in den übrigen $2^1/_2$ l-Portionen 85 bis 90% anzuwenden. Aber auch die in größerem Maßstab z. B. mit einigen Litern Hefeauszug ausprobierte Teiladsorption ist nicht reproduzierbar, sondern das Ergebnis wird von der Art, wie das Adsorbens eingetragen, wie geschüttelt wird u. dgl., stark beeinflußt.

Die Präparate werden reiner, wenn das Enzym aus dem Hefeauszug nicht vollständig adsorbiert wird. Aber der Erfolg dieser Verbesserung kann durch Störungen beim Eluieren oder durch größere Zersetzlichkeit des [77] Invertins in der Elution leicht wenigstens teilweise verloren gehen. Zum Beispiel verarbeiteten wir von einem Hefeauszug 25 l mit vollständiger Adsorption und gewannen aus dem Adsorbat 13,1 g Invertin vom Zeitwert 5,5; andererseits wurden aus 4 l nur 70% adsorbiert mit dem

Ende, daß die Elution ein Präparat vom Zeitwert 2,6 lieferte, aber in viel weniger günstiger Ausbeute (0,4 g).

Das Versuchsmaterial ist zu umfangreich und, da die Hefeauszüge ähnlich wechselnde Beschaffenheit wie die Hefe selbst haben, zu kompliziert, um veröffentlicht zu werden. In der Tab. 23 sei nur für die fraktionierte Adsorption ein Beispiel angeführt, das den flachen Beginn, sodann das steile Ansteigen und das asymptotische Ende der Adsorptionskurve zeigt. Für die Anwendung von Adsorptionsgesetzen ist die Zusammensetzung der Lösungen und der Adsorbate viel zu komplizierte.

Tabelle 23.
Gang der Adsorption des Invertins (Anhang Nr. 123 und 124).

Aluminiumhydroxyd Proz.	Adsorbiertes Invertin Proz.	Aluminiumhydroxyd Proz.	Adsorbiertes Invertin Proz.
1,5	0	16	3
9	17,5	50	72
18	36,5	66	89
32	70,5	83	96

IV. Elution des Invertins aus dem Tonerdeadsorbat.

1. Elution mit verschiedenen Mitteln.

Das Adsorbat von Invertin in Aluminiumhydroxyd gibt an reines Wasser kein Enzym ab, auch nicht an kohlensäurehaltiges und mit Essigsäure angesäuertes. Eluentien sind in erster Linie Rohrzucker, der das Adsorbat quantitativ zerlegt (vgl. Abschn. III, 3), in zweiter ein schwach alkalisch reagierendes Salz, nämlich [78] Dinatrium- oder Diammoniumphosphat, in dritter Linie Ammoniak und Ammonoxalat, in vierter Natriumcarbonat und Pyridin. Von den sekundären Phosphaten, die dem Ammoniak weit überlegen sind, machten wir in großem Maßstab seltener Anwendung, weil in diesem Fall die Elution der Dialyse unterworfen werden mußte, ehe man sie fällen oder für eine weitere Adsorption verwenden konnte.

Die Adsorbate verhalten sich je nach den Umständen ihrer Bildung und nach der Entstehung der Invertinlösung verschieden. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Verarbeitung von Hefeauszügen der raschen Autolyse, die mit Aceton verdünnt und mit Kaolin behandelt wurden, mit Aluminiumhydroxyd, das nach quantitativer Aufnahme des Enzyms rasch in der Zentrifuge abgetrennt und dreimal mit Wasser gewaschen wurde. Den Invertingehalt der Elution bestimmten wir in dieser selbst nach der Trennung von der Tonerde unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition.

1. Adsorbat (Anhang Nr. 125).

	Proz. Invertin
Elution mit 1 proz. Na_2HPO_4	70,5
„ „ 1 proz. $(NH_4)_2HPO_4$	78,2
„ „ 0,04 proz. Ammoniak	40,6
„ „ 1 proz. Ammonoxalat[1]	36,5

[1] Für diesen Versuch diente eine andere, ähnliche Darstellung des Adsorbates.

Das Verhältnis zwischen Soda und Ammoniak ging aus einem Vergleich hervor, in welchem ein Adsorbat zum Teil von 0,018n-Ammoniak, andererseits mit 0,018n-Natriumcarbonat eluiert wurde. Die ammoniakalische Elution enthielt dreimal mehr Invertin als die Sodalösung. In ähnlichem Maße ist Pyridin ungünstiger wie Ammoniak.

Die Adsorbate verbrauchen sofort eine gewisse Menge Alkali, z. B. dasjenige aus 1 l Hefeauszug (1 Tl. Hefe und 2 Tle. Wasser) 0,3 g Ammoniak. Sie [79] geben an Alkalilösungen, die zu ihrer Neutralisation nicht genügen, sehr wenig Invertin ab. Wenn aber die Alkalimengen zur Absättigung der Adsorbate ausreichen, so befördert eine Vermehrung die Elution kaum mehr. Es ist daher leicht, bei der Elution im Beständigkeitsbereich des Invertins zu bleiben, das sich nach C. S. HUDSON und H. S. PAINE[1] bei 15° bis 0,02n-Hydroxylion erstreckt. Wurde das wie oben dargestellte Adsorbat aus 100 ccm Hefeauszug mit Wasser wieder auf 100 ccm gebracht, so gingen bei 0,002% Ammoniakgehalt des Wassers (oder noch 5mal weniger) nur 5 bis 8% vom Invertin in die Elution über, dagegen in dasselbe Volumen von 0,02proz. Ammoniak 50, von 1proz. 59% des Invertins. Wiederholte Einwirkung von verdünntem Ammoniak ließ den eluierten Anteil bis auf 65% ansteigen. Durch Zusatz von Salzen, z. B. von Calciumchlorid oder Ammonacetat, wurde die Elution vermindert und bei größerer Konzentration des Elektrolyten ganz gehemmt. Anders verhält es sich mit phosphorsauren Salzen, z. B. Mononatriumphosphat, das zusammen mit Ammoniak so günstig wie Dinatriumphosphat wirkt.

		Proz. Invertin
	2. Adsorbat (Anhang Nr. 126)	
1.	Elution mit 0,04proz. NH_3	42,3
2.	0,04proz. NH_3 und 0,005proz. $CH_3CO_2NH_4$	37,5
3.	0,04proz. NH_3 und 0,05proz. $CH_3CO_2NH_4$	23,8
4.	0,04proz. NH_3 und 0,2proz. $CH_3CO_2NH_4$	0
5.	0,04proz. NH_3 und 0,005proz. Asparagin	38,4
6.	0,04proz. NH_3 und 0,05proz. Asparagin	35,3
7.	0,04proz. NH_3 und 0,5proz. Asparagin	12,7
	3. Adsorbat (Anhang Nr. 127)	
1.	Elution mit 0,04proz. NH_3	54
2.	0,04proz. NH_3 und 0,005proz. $CaCl_2$	10
3.	0,04proz. NH_3 und 0,05proz. $CaCl_2$	4
4.	0,04proz. NH_3 und 1proz. $CaCl_2$	0
[80]	4. Adsorbat (Anhang Nr. 128)	
1.	Elution mit 0,04proz. NH_3	47
2.	ohne NH_3 mit 0,05proz. NaH_2PO_4	0
3.	mit 0,04proz. NH_3 und 0,05proz. NaH_2PO_4	66,5
4.	0,04proz. NH_3 und 0,005proz. NaH_2PO_4	54
5.	0,05proz. NH_3 und 0,5proz. NaH_2PO_4	82,5
6.	0,05proz. NH_3 und 2proz. NaH_2PO_4	81,7
7.	1proz. NH_3 und 0,5proz. NaH_2PO_4	41

Diese Versuche bedeuten nur eine Vorarbeit für die präparativen Zwecke. Sie lassen sich mit reineren Präparaten nicht ohne weiteres exakter gestalten, weil für

[1] Journ. Am. chem. Soc. 32, 774, 985, 1220 [1910].

das beschriebene Verhalten des Invertins beim Eluieren eben seine Beimischungen mitverantwortlich sind.

2. Einfluß der Koadsorbentien und Koeluentien.

Die Begleitstoffe des Invertins wirken bei seiner Adsorption und noch viel mehr bei der Elution aus dem Adsorbate mit. Sie sind nach der Rolle, die sie spielen, wie im I. Abschnitt dieses Kapitels ausgeführt wurde, als Koadsorbentien und Koeluentien zu unterscheiden.

Verhalten der durch rasche Autolyse gewonnenen Hefeauszüge.

An der Elution mit verdünntem Ammoniak sind Begleitstoffe beteiligt. Wird der Hefeextrakt einer Vorreinigung mit Bleiacetat, die weitergehend als die mit Kaolin ist, unterworfen, so fehlen diese Begleiter. Unter gleichen Bedingungen wie sonst entstehen mit Aluminiumhydroxyd Adsorbate, die durch Ammoniak nicht eluiert werden. Sekundäre Phosphate, die das Ammoniak in der Wirkung auf die Adsorbate übertreffen, legen auch in diesem Falle Invertin aus dem Aluminiumhydroxyd frei.

1. Versuch. Der Hefeauszug wurde mit überschüssigem Bleiacetat vollständig gefällt; nach der Entfernung des Bleis mit Schwefelwasserstoff führten wir aus acetonhaltiger Lösung das Invertin quantitativ in Adsorbat [81] über. Dieses gab an 0,04 proz. Ammoniak nur eine Spur Invertin ab.

2. Versuch. Ein anderer Hefeauszug, mit Kaolin gereinigt, lieferte nach dem beschriebenen Verfahren ein Adsorbat, das mit Ammoniak in normaler Weise eluiert wurde; die Elution enthielt etwa 40% vom Invertin der Enzymlösung.

Von diesem Extrakt wurde ein Teil mit Bleiacetat gereinigt (500 ccm mit 14 g Bleiacetat); bei der Ausfällung des Bleiüberschusses und Klärung durch Kieselerde verlor die Lösung 25% vom Invertin. Nach Zusatz von 40% Aceton adsorbierten wir das Invertin vollständig mit Aluminiumhydroxyd. Das Adsorbat wurde geteilt. Ein Anteil gab an 0,04 proz. Ammoniak höchstens 1% vom Invertin der angewandten Lösung ab; nach Abtrennung der Elution enthielt das Aluminiumhydroxyd noch 61% des Invertins. Ein anderer Teil des Adsorbates lieferte mit 1 proz. Diammonphosphat eine Elution, die 66% vom Invertin des Extraktes enthielt (Anh. Nr. 129).

3. Versuch. Eine andere Hefeflüssigkeit der raschen Autolyse wurde zum Teil mit Bleiacetat gereinigt. Das Adsorbat daraus gab an 0,04 proz. Ammoniak nur 3%, hingegen an 1 proz. Diammonphosphat 40% vom Invertin des Hefeauszuges ab (Anh. Nr. 130).

Der übrige Teil des Extraktes wurde ohne Bleiacetat und ohne Kaolinbehandlung, aber mit Aceton verdünnt, zur Adsorption verwendet. Aus dem Adsorbat eluierte 0,04 proz. Ammoniak 49% des Invertins (Anh. Nr. 131).

4. Versuch. Nicht so eindeutig sind Erscheinungen zu erklären, die bei der Adsorption aus acetonfreien, ungereinigten Hefeauszügen beobachtet wurden. Ein so gewonnenes, 3 mal mit Wasser gewaschenes Adsorbat schickte bei der Elution mit

0,05proz. Ammoniak nur ein Drittel der gewöhnlichen Menge, nämlich 14% [82] des Invertins (bezogen auf den Hefeauszug) in Lösung (Anh. Nr. 132). Da das Aluminiumhydroxyd aus der wäßrigen Lösung mehr von organischen Verbindungen aufnimmt als aus der acetonhaltigen, so ist es möglich, daß in diesem Falle im Adsorbat die Stoffe vermehrt sind, die das Invertin an die Tonerde binden. Es kann aber auch sein, daß Koeluentien in der wäßrigen Lösung zurückbleiben, die aus acetoniger mit in das Aluminiumhydroxyd gehen.

5. Versuch. Wird aber das Invertin einer Elution nach dem Verjagen des Ammoniaks im Vakuum zum zweiten Male in wäßriger (acetonfreier) Lösung durch Aluminiumhydroxyd adsorbiert, so verhält sich das Adsorbat normal. Es gibt das Invertin an Ammoniak ab; wir fanden 40% in der Elution (Anh. Nr. 133).

6. Versuch. Noch schwerer eluierbar ist das Invertin in einem aus ammoniakhaltigem, acetonfreiem Hefeauszug gebildeten Adsorbat. In einem Falle enthielt die ammoniakalische Elution aus einem solchen Adsorbat gar kein Invertin. In einem anderen Falle wurden 2,5% des Invertins durch Ammoniak eluiert, bei wiederholter Elution noch 1% (Anh. Nr. 134). Hingegen nahm Diammonphosphat die normale Menge Invertin, 48%, auf.

Wenn auch hier wie beim 4. Versuch verschiedene Erklärungen möglich sind, so ist die Annahme unumgänglich, daß Begleitstoffe für diese Erscheinung verantwortlich sind.

Verhalten der durch Neutralextraktion dargestellten Hefeauszüge.

Die Erscheinungen sind hier umgekehrt wie bei unseren gewöhnlichen Invertinlösungen. Das Adsorbat aus dem acetonhaltigen Neutralextrakt ist nicht durch Ammoniak eluierbar, wird es aber dadurch, daß man aus dem Extrakt zuerst mit Bleiacetat Eiweißkörper [83] beseitigt und dann adsorbiert. Man könnte diese Beobachtung, wenn sie für sich allein stände, durch Vorhandensein von Koadsorbentien und Fehlen derselben nach der Bleiacetatfällung zu erklären suchen. Die verschiedenen Beobachtungen, die hier angeführt werden, machen aber in ihrer Gesamtheit die Erklärung wahrscheinlicher, daß das Adsorbat aus dem Neutralextrakt an Koeluentien arm ist, und daß das Adsorbat infolge der Reinigung auch Koadsorbentien verloren hat, infolgedessen das Invertin lockerer gebunden enthält. Die Koadsorbentien des Neutralextraktes können nicht identisch sein mit denen im sauer gebildeten Hefeauszug. Sie sind im ersteren Falle durch Bleiacetat fällbar, im letzteren nicht.

7. Versuch. Ein mit Diammonphosphat und Toluol dargestellter Hefeauszug lieferte ohne Vorbehandlung ein Adsorbat mit $Al(OH)_3$, das an 0,04proz. Ammoniak sehr wenig Invertin abgab. Die Elution bewirkte in 15 Minuten langer Einwirkung auf Rohrzucker nur spurenweise Bildung von reduzierendem Zucker.

8. Versuch. Ein unter Neutralisation mit Ammoniak dargestellter Hefeauszug gab ohne Vorbehandlung ein Adsorbat, dem Ammoniak 2% des Invertins entzog (Anh. Nr. 135). Denselben Extrakt behandelten wir mit so viel Bleiacetat, daß etwas

Blei im Filtrat nachzuweisen war, daß aber mit mehr Bleiacetat noch eine weitere Fällung entstanden wäre. Nun lieferte die Invertinlösung mit Aluminiumhydroxyd ein Adsorbat, das an 0,04 proz. Ammoniak 60% vom Invertin des gereinigten Extraktes abgab.

War derselbe Extrakt mit Bleiacetat vollständig gefällt worden, so konnten dem Adsorbat mit Ammoniak 37% Invertin entzogen werden.

9. Versuch. Ein anderer mit Ammoniak dargestellter Extrakt wurde gleichfalls vollständig mit Bleiacetat gefällt. Das Adsorbat daraus lieferte eine [84] ammoniakalische Elution, die 18% des Invertins enthielt (Anh. Nr. 136).

10. Versuch. Mit einem gleichartigen Hefeauszug wurde der Versuch wiederholt. Die ammoniakalische Elution enthielt 28%, hingegen eine mit 1 proz. Ammonphosphat gebildete 50% vom Invertin (Anh. Nr. 137).

11. Versuch. Daß das abweichende Verhalten der unter Neutralisation dargestellten Invertinlösung nicht auf ihrem Ammoniakgehalt beruht, zeigte die Eluierbarkeit des Adsorbates aus dem nach Hudson gewonnenen und mit Ammoniak versetzten Hefeauszug. Aus der acetonhaltigen Lösung wurde bei einem Gehalt von 0,1% NH_3 das Adsorbat dargestellt. Es war so leicht eluierbar, daß schon beim Waschen des Adsorbates infolge seines Ammoniakgehaltes 23,5% des Invertins abgegeben wurden, während das Adsorbat 43% vom Invertin behielt (Anh. Nr. 138).

V. Adsorption durch Calciumphosphat und Elution.

Invertin wird von tertiärem Calciumphosphat adsorbiert und läßt sich durch Umwandeln des Niederschlages in sekundäres Phosphat eluieren.

Werden Hefeauszüge mit Diammonphosphat, Calciumchlorid und Ammoniak versetzt, so enthält der amorphe Niederschlag nach einigem Stehen das Enzym. Für die Mehrzahl der Versuche unterwarfen wir das Invertin zuvor der Reinigung mit Aluminiumhydroxyd. Die mit sekundärem Alkaliphosphat gewonnene Elution wird von Calciumchlorid gefällt, ohne daß Invertin in die Fällung übergeht. Als wir hingegen die Elution nach Zusatz von Ammoniak mit Calciumchlorid fällten, adsorbierte der voluminöse, plastische Niederschlag das Invertin entweder quantitativ oder zum großen Teil. Dieses Adsorbat gibt an Ammoniak und an sekundäres Phosphat kein und an verdünnte Essigsäure (0,02 n) wenig Invertin [85] ab. Verwandelt man aber den Niederschlag in sekundäres Calciumphosphat, so geht das Enzym daraus vollständig in Lösung. Das enzymhaltige Tricalciumphosphat wurde abfiltriert, in Wasser suspendiert und mit überschüssigem Mononatriumphosphat versetzt. Darauf verwandelte es sich in einer oder in zwei Stunden in kompaktes und krystallinisches Dicalciumphosphat, das kein Invertin zurückhielt. Als Ausgangsmaterial für die quantitativen Bestimmungen dienten Tonerdeadsorbate aus Neutralextrakten, die wir mit Diammonphosphat eluierten.

		(Anhang Nr. 139	140	141)
Angewandte Invertinlösung	M.Z.Q.	3,38	2,86	4,15
Elution aus Calciumphosphat	M.Z.Q.	3,38	1,08	3,62
Invertinausbeute	%	100	70	87

Leider war in diesen, im präparativen Maßstab untersuchten Beispielen weder die Adsorption noch die Elution in genügendem Maße selektiv. Nachdem die Elutionen vom überschüssigen primären Phosphat durch Dialyse befreit waren, ergaben die Bestimmungen nur Zeitwerte von 4,55, 5,4 und 6,4.

VI. Adsorption des gereinigten Invertins durch Kaolin und Elution.

Das aus dem Tonerdeadsorbat eluierte Invertin, und zwar erst dieses, ist adsorbierbar durch Kaolin. Durch die Behandlung mit Aluminiumhydroxyd ist das Enzym von den Koadsorbentien, Begleitstoffen überwiegend saurer Natur, abgetrennt worden, mit denen es zuvor assoziiert war. Es zeigt in diesem Reinheitsgrad das Verhalten eines amphoteren Stoffes und wird nun sowohl von elektronegativen wie elektropositiven Adsorbentien aufgenommen.

Es ist nicht nötig, die Adsorption wie beim Aluminiumhydroxyd durch Beimischung von Aceton oder einem anderen organischen Lösungsmittel zu befördern; das Invertin ist auch schon so arm an Schutzstoffen, [86] daß es in den organischen Solvenzien rasch verderben würde. Das Adsorptionsvermögen des Kaolins wird erhöht, wenn man es stundenlang in 20proz. Salzsäure erhitzt und durch häufiges Dekantieren mit destilliertem Wasser auswäscht, wobei es sich schließlich kolloid verteilt. Die zur Adsorption anzuwendenden Kaolinmengen erscheinen im Vergleich mit der Vorbehandlung der Hefeauszüge viel größer, wenn man sie auf Trockengewichte der Lösungen bezieht, aber viel geringer im Verhältnis zu den Invertingehalten. Wir behandelten z. B. die mit Ammoniak dargestellte und einige Tage dialysierte Elution aus dem Tonerdeadsorbat, die neutral reagierte, mit Kaolin; eine Elution vom M.Z.Q. 0,7, ca. 0,25 g Trockensubstanz in 130 ccm enthaltend, gab an 10 g Kaolin 84% des Invertins (Anh. Nr. 142) ab und verlor auf Zusatz von nochmals derselben Menge Kaolin das Invertin gänzlich. Diese Adsorption wurde durch zwei Umstände wesentlich verbessert und die erforderliche Kaolinmenge herabgemindert: Anstatt der Elutionen unterwarfen wir die durch Fällung mit Aceton daraus isolierten Invertinpräparate, die namentlich große Mengen von Ammoniumsalzen in der Mutterlauge zurückließen, der Adsorption. Ferner erfolgt diese viel leichter in schwach essigsaurer Lösung, z. B. in 0,04normaler, für die nur etwa 1/5 der Kaolinmenge wie für entsprechende neutrale Lösungen erforderlich ist.

Die Adsorption durch Kaolin führt zu einer Methode der Trennung vom Hefegummi, der in seiner ganzen Menge in der Mutterlauge zurückbleibt. Für die Steigerung der Enzymkonzentration ist dies von großer Bedeutung. Denn wir fanden beispielsweise in einem durch Aluminiumhydroxyd gereinigten Invertinpräparat 65 bis 75% Hefegummi, H. v. Euler und O. Svanberg[1] noch mehr in ihren letzten Invertinpräparaten, die bei der [87] Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure 75 bis 92% Monose lieferten. Nach der Elution aus dem Kaolin gibt das Invertin mit Fehlingscher

[1] Siehe Kap. A, Abschn. VIII.

Lösung keinen Niederschlag, und nach bis zu 2stündigem Kochen mit 20proz. Salzsäure bewirkt es keine Reduktion der Fehlingschen Lösung. In der Mutterlauge von der *Kaolinbehandlung finden sich außer dem Hefegummi noch Ammonsalze, wenig Eiweiß,* mitunter etwas Aminosäure.

Aus dem Kaolinadsorbat läßt sich das Invertin durch sekundäres Alkaliphosphat, Natriumcarbonat oder Ammoniak eluieren. Am besten gelingt die Elution durch Suspendieren des Adsorbates in Wasser und Versetzen mit so viel 0,2n-Sodalösung, bis die Flüssigkeit alkalisch zu reagieren beginnt. Das Kaolin wird dabei zum Teil kolloid und die Elution ist kaum filtrierbar. Die Klärung wird erreicht, indem man die Hauptmenge des Kaolins mit der Zentrifuge abtrennt und die trübe Elution auf der Nutsche durch eine Schicht von geglühtem Kieselgur absaugt. Nach vergleichenden Bestimmungen tritt dabei kein Verlust an Invertin ein.

Die Ausbeuten, für die einige Beispiele in der Tab. 24 angeführt sind, leiden, wenn die Kaolinadsorbate nicht rasch genug verarbeitet werden, da das Enzym in ihnen allmählich in unwirksame Form übergeht. Aus einem 48 Stunden aufbewahrten Adsorbat war nur noch ein Viertel des angewandten Invertins zu gewinnen. Die wahren Ausbeuten bei der Reinigung durch Kaolin sind in einigen Fällen höher als die in der Tabelle verzeichneten, denn die angewandten Invertinlösungen waren nach dem Filtrieren von ein wenig unlöslich gewordener Substanz mitunter etwas schwächer als gemäß den hier verzeichneten Bestimmungen der Präparate; und es kam vor (Versuch 4), daß die Elution aus dem Kaolin erst nach Stehen und Eindampfen bestimmt wurde. In günstigen Fällen erreichte die Ausbeute bei der Adsorption und Elution zwei Drittel des angewandten Enzyms.

[88] Tabelle 24. Ausbeute bei der Elution aus dem Kaolinadsorbat.

Nr.	Angew. Invertin g	Angew. Invertin Zeitwert	Kaolinmenge g	M.Z.Q. des angew. Invertins	M.Z.Q. der Elution	Invertinausbeute Proz.
1. (Anh. Nr. 143)	0,02	2,8	27,4	6,58	4,13	63
2. (Anh. Nr. 144)	7,47	6,0	217	25,0	17,7	70
3. (Anh. Nr. 145)	3,5	4,5	83	13,6	9,3	68
4. (Anh. Nr. 146)	4,4	2,5	72,5	32,0	15,3	48
5. (Anh. Nr. 147)	17,6	4,7	270	75	20,8	40
6. (Anh. Nr. 148)	ca. 4	8	150	7,0	4,1	58

Auch andere elektronegative Adsorbentien nehmen das aus dem Tonerdeadsorbat eluierte Invertin auf. Wir beobachteten mit gefällter und sorgfältig ausgewaschener Kieselsäure quantitative Adsorption, desgleichen mit dem durch Elektroosmose dargestellten Kieselsäurepräparat Osmosil[1], dessen Adsorptionsvermögen etwa viermal geringer war. Hingegen adsorbierte Mastix, wovon ebensoviel wie vom Kaolin angewandt wurde, Invertin von demselben Reinheitsgrad gar nicht.

[1] Siehe L. MICHAELIS, Berl. klin. Wochenschr. 1918, 710; R. WILLSTÄTTER, diese Annalen **422**, 65 [1920/21].

VII. Zur Dialyse der Invertinlösungen.

Die Dialyse der Invertinlösungen wurde außer in den älteren Angaben von W. A. OSBORNE[2], M. KÖLLE[3] und B. HAFNER[4] in den Arbeiten von C. S. HUDSON und H. S. PAINE[5] und C. S. HUDSON[6], sowie in eingehenden Untersuchungen von [89] H. v. EULER und O. SVANBERG[1]) behandelt. Bei HUDSON ist nach der Ausfällung von Eiweiß mit Bleiacetat und von Blei mit Schwefelwasserstoff die rasche Entfernung der Essigsäure durch Dialyse geboten, die in Kollodiumhülsen vorgenommen wird. EULER und SVANBERG streben durch die Dialyse die Entfernung stickstoffhaltiger Verunreinigungen an; Hand in Hand damit geht eine Aktivitätssteigerung von beispielsweise 12, 39, 40 und 16%. SVANBERG beobachtete dabei großen Enzymverlust, z. B. 43%, und führte ihn auf die Durchlässigkeit der Kollodiumhülsen für Invertin zurück. EULER und SVANBERG zeigten aber vor kurzem, daß in einer Reihe von Dialysen die Saccharaseverluste, die 10 bis 20% betrugen, nicht auf der Durchlässigkeit der Membran für das Enzym beruhten und auch nicht auf der Dialysierbarkeit eines Koenzyms. Es wird daher anzunehmen sein, daß das Invertin sich partiell zersetzt. Dies kann eher bei dem herausdiffundierten als bei dem im Dialysator zurückgebliebenen, durch Kolloide mehr geschützten Invertin der Fall sein.

Auch in unseren Versuchen wurden anfangs immer die nach HUDSON dargestellten Kollodiumhülsen angewandt. Dabei trat in allen Fällen Verlust an Invertin ein, der sich zwischen 20 und 33% bei 1- bis 2tägiger Dauer der Dialyse gegen fließendes Wasser bewegte.

Eine nach der Reinigung mit Aluminiumhydroxyd und darauffolgenden Adsorption durch Calciumphosphat dargestellte Mononatriumphosphatelution wurde 20 Stunden dialysiert. Dabei ging M.Z.Q. von 3,38 auf 2,77 zurück, entsprechend einem Verlust an Invertin von 18% (Anh. Nr. 149).

Eine zweite Elution von ähnlicher Darstellung wurde 48 Stunden dialysiert; M.Z.Q. anfangs 3,61, am Ende 2,42. [90] Verlust an Invertin 33% (Anh. Nr. 150). Im umgebenden Wasser ließ sich Invertin nachweisen. Aber nach den Angaben von EULER und SVANBERG dürfte auf das Herausdiffundieren allein nur ein Teil des Enzymverlustes zurückzuführen sein.

Die Erklärung der Invertinabnahme bei der Dialyse sollte wohl auch berücksichtigen, daß die Reinheit der Invertinlösungen darauf Einfluß haben kann. HUDSON hat nämlich in zahlreichen Bestimmungen gefunden, daß bei der Dialyse seiner Präparate, deren Reinigung lediglich in Eiweißbeseitigung bestand, kein Verlust eintrat; geringe Invertinabnahmen könnten dabei übersehen worden sein. Die Präparate von EULER und SVANBERG waren reiner, sie waren durch Entfernung von Eiweiß

[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 300 [1899]. [3] Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**, 420 [1900].
[4] Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**, 1 [1904]. [5] Journ. Am. chem. soc. **32**, 774 [1910].
[6] Journ. Am. chem. soc. **36**, 1566, 1569 [1914].
[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 266, und zwar S. 303 [1919]; O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65, und zwar S. 90 [1920]; H. v. EULER und O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 175 [1920].

mit Kaolin und fraktionierter Fällung mit Alkohol gereinigt, die unseren noch weitergehend durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution. Wahrscheinlich hat die Abtrennung der Begleitstoffe, die eine Schutzwirkung ausüben können, zwei Folgen: verminderte Beständigkeit und erhöhtes Diffusionsvermögen des Invertins.

Es gelingt uns, durch Anwendung von weniger durchlässigen Dialysatoren, von tierischen Membranen, langdauernde Dialyse ohne Invertinverlust durchzuführen. Allerdings auch unter Bedingungen, unter welchen Invertin völlig beständig sein kann, erleidet es manchmal Einbuße an Wirksamkeit, also teilweise Zersetzung. Die Ursachen sind noch nicht genügend bekannt. Wir fanden in vielen quantitativen Versuchen, daß Invertinlösungen dialysiert, aufbewahrt, eingedampft werden können, ohne Änderung der Zeitwerte. Dennoch beobachteten wir bei jeder dieser Maßnahmen mitunter kleine oder erhebliche Invertinverluste.

Bei reineren Invertinlösungen erweist sich die Kollodiummembran für die Dialyse als ungeeignet; wir ziehen die schon von E. STARKENSTEIN[1] angewandten sog. Fischblasen vor, in denen 250 bis 300 ccm dialysiert [91] werden können. Unter unseren *Versuchsbedingungen war eine 1 proz. Mononatriumphosphatlösung in $1^1/_2$ bis 2 Tagen frei von Phosphat.* Die Tab. 25 zeigt, daß es auf diese Weise möglich ist, aber nicht immer gelingt, die schon weitgehend gereinigten und daher empfindlichen Invertinpräparate der Elutionen aus dem Kaolinadsorbat ohne Verlust zu dialysieren. Die Elutionen waren von 2 l anfänglichem Volumen auf 300 ccm eingeengt und mit Toluol versetzt.

Tabelle 25. Invertingehalt der dialysierten Elutionen.

Nr.	Dauer der Dialyse	M.Z.Q. vor der Dialyse	M.Z.Q. nach der Dialyse	Abnahme Proz.
1. (Anh. Nr. 151)	3 Tage	8,15	8,07	1
2. (Anh. Nr. 152)	2 "	14,5	11,0	24
3. (Anh. Nr. 153)	6 "	5,25	5,15	2
4. (Anh. Nr. 154)	6 "	11,7	11,1	5
5. (Anh. Nr. 155)	5 "	2,7	2,8	0
6. (Anh. Nr. 156)	3 "	3,1	2,68	14

Diese Dialyse wenden wir zu präparativen Zwecken an, um aus den Elutionen die anorganischen Salze zu entfernen, die Alkaliphosphate gewisser Elutionen aus Tonerdeadsorbat, das Natriumcarbonat aus der Kaolinelution. Die hellbräunlichen Lösungen werden dabei farblos und verlieren ihren noch an Hefeextrakt erinnernden Geruch. Mit dieser Entfernung der dialysierenden Begleitstoffe konnte eine Steigerung des Reinheitsgrades um etwa 30% erzielt werden. Zum Beispiel verbesserte sich der Zeitwert eines aus Kaolinadsorbat isolierten Präparates bei 6tägiger Dialyse von 0,8 auf 0,55.

[1] Biochem. Ztschr. **24**, 210 [1910].

VIII. Verhalten der Invertinlösungen gegen Uranylacetat.

Die nach den Adsorptionsmethoden gereinigten Invertinpräparate gaben mit Uranylacetat Niederschläge. Die Fällung läßt sich derart ausführen, indem man rasch [92] mit überschüssiger Uranlösung versetzt, daß das Invertin ganz oder zum größten Teil adsorbiert wird, oder bei vorsichtigem Zusatz von Uranylacetat unter Vermeidung eines Überschusses so, daß es zum großen Teil in der Mutterlauge hinterbleibt. Auf beide Arten läßt sich das Invertin weiter reinigen. Der präparativen Anwendung des Verfahrens waren aber mehrere Umstände hinderlich. Das mit Aluminiumhydroxyd, dann mit Uranylacetat gereinigte Invertin ließ sich zwar weiterhin von Kaolin quantitativ adsorbieren, aber aus dem Adsorbat schlecht durch Ammoniak eluieren. Wurde aber zuerst das Tonerde- und Kaolinverfahren ausgeführt und eines der reinsten Invertinpräparate der Uranylacetatbehandlung unterworfen, so erwies sich das wieder isolierte Invertin als besonders unbeständig, so daß schon beim Stehen der Lösung Abnahme der Wirksamkeit eintrat und der gefundene Zeitwert nicht dem theoretisch berechneten entsprach. Übrigens war auch das Verhalten der aus Kaolinadsorbaten gewonnenen Elutionen gegen Uranylacetat infolge ihres schwankenden Gehalts an Begleitstoffen zu ungleichmäßig. Es kam vor, daß Elutionen anfangs durch Uranacetat *fällbar* waren, aber *nicht mehr nach der Dialyse*. Auch der umgekehrte Fall wurde beobachtet: Elutionen aus Kaolinadsorbaten waren nicht fällbar mit Uranylacetat, aber nach der Dialyse gaben sie Niederschläge mit diesem Reagens.

Versuche mit Elution aus Tonerdeadsorbat. Beim Versetzen mit einem Überschuß von Uranylacetat entstand ein gelblicher, flockiger Niederschlag, der alles Invertin adsorbiert enthielt. Die Fällung gab an verdünnte Sodalösung zusammen mit wenig Uran das Enzym zum großen Teil ab. Um aber hauptsächlich die Beimischungen des Invertins auszufällen, verarbeiteten wir 2,5 g eines Präparats vom Zeitwert 3,3 mit einer zur Fällung nicht ausreichenden Uranmenge. Bei vorsichtigem Zusatz einer 2proz. Uranylacetatlösung, [93] wovon 80 ccm angewandt wurden, entstand ein reichlicher Niederschlag, der sich gut abfiltrieren ließ. In der Mutterlauge waren 77% vom Invertin (Anh. Nr. 157); in einem anderen Versuch 84% (Anh. Nr. 158). Nach der Dialyse enthielt die Lösung 0,8 g Invertin vom Zeitwert 1,45. Sie gab keine Ninhydrinreaktion mehr, die Xanthoproteinreaktion nur schwach, enthielt aber reichlich Hefegummi. In diesem Zustand wurde das Invertin vollständig adsorbiert von Kaolin, aber nur 25% daraus mit Ammoniak eluiert.

Versuch mit Elution aus Kaolinadsorbat. 0,5 g eines Präparates vom Minutenwert 0,7 wurden in zwei Hälften verarbeitet.

1. Beim Fällen mit überschüssigem 2proz. Uranylacetat (80 ccm) nahm der Niederschlag das Invertin gänzlich auf. Wir eluierten ihn zweimal mit 0,01 n-Natriumcarbonat und fanden in der durch längeres Zentrifugieren geklärten Elution 55% (Anh. Nr. 159) des angewandten Enzyms (in einer dritten Elution weitere 10%). Diese Lösung bildete bei der Dialyse einen uranhaltigen Niederschlag, der 30% des Invertins der Elution einschloß. Die davon abfiltrierte Flüssigkeit enthielt Invertin

von ungünstigerem Zeitwert, nämlich 1,4. Beim Stehen in einem Kolben aus Jenaer Glas verdarb die mit Toluol versetzte Invertinlösung allmählich, obwohl sie klar blieb. In 3 Wochen verschlechterte sich der Zeitwert auf 1,96.

2. Um aus der Invertinlösung hauptsächlich Begleitstoffe zu fällen, versetzten wir sie unter Rühren langsam mit 32 ccm Uranlösung. Die Mutterlauge von dem entstandenen Niederschlag enthielt noch 51% des Invertins (Anh. Nr. 160). Bei 6tägiger Dialyse ging M.Z.Q. von 2,9 auf 2,3 zurück. Der Zeitwert des Präparates betrug nun 1,2, er erhöhte sich beim Stehen im Jenaer Kolben in 3 Wochen auf 1,7 durch Zersetzung von etwa 30%.

[94]

C. Invertinpräparate[1].

I. Einleitung.

Um die chemische Art eines kohlehydratspaltenden Enzyms der Hefe kennen zu lernen, müssen Wege für seine Trennung von einem Vielfachen an Begleitstoffen aus den Klassen der Proteine und der Kohlehydrate aufgesucht und die Bedingungen ermittelt werden, unter denen das mit zunehmender Reinheit zunehmend empfindliche Enzym konstante Wirkung behält. Die Literatur verzeichnet viele wertvolle Untersuchungen über die Darstellung von Invertin hohen Reinheitsgrades, unter welchen die genauen Angaben von H. v. EULER und seinen Mitarbeitern hervorragen. Während H. v. EULER und O. SVANBERG der Lösung des Problems durch Züchtung enzymreicher Hefe zu Hilfe kommen, arbeiten wir an neuen präparativen Methoden, mit denen die Abtrennung der Eiweißstoffe und des Hefegummis gelingt.

Die besten Invertinpräparate[2] sind von J. MEISENHEIMER, C. S. HUDSON und H. v. EULER und O. SVANBERG dargestellt worden.

C. S. HUDSON hat für seine Invertinpräparate keine Angaben veröffentlicht, die dem Zeitwert nach C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON entsprechen. Indem wir aber Invertin sowohl unter den Bedingungen von HUDSON wie unter den Verhältnissen der Zeitwertdefinition messen (Kap. A, Abschn. IV, 7), finden wir einen Schlüssel zum Vergleich der Präparate von HUDSON mit denen von EULER und mit den unseren. Es scheint, daß das dialysierte Invertin von HUDSON[3] etwa den Minutenwert 3 erreicht.

J. MEISENHEIMER, ST. GAMBARJAN und L. SEMPER[4] verarbeiteten durch geeignete Ernährung enzymreich [95] gezüchtete Hefe. Aus dem Preßsaft erhielten sie nach Ausfällung von Begleitstoffen durch Säure Präparate vom Zeitwert 21, wohl auch etwas bessere. Durch Anwendung der Autolysenverfahren wird dieses Ergebnis übertroffen.

H. v. EULER und O. SVANBERG[5]) verdanken ihren Erfolg gleichfalls sehr invertinreich gezüchteter Hefe (Zeitwert 100 bis 90). Durch Beseitigung der Eiweißstoffe

[1] Über das experimentelle Material finden sich ausführlichere Angaben in der gedruckten Dissert. von F. RACKE, München 1920.

[2] Siehe die kritische Übersicht von H. v. EULER und O. SVANBERG, Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 269, und zwar S. 303 [1919].

[3] Journ. Am. chem. soc. **36**, 1566 [1914]. [4] Biochem. Ztschr. **54**, 122 [1913].

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 269 [1919].

mit Kaolin und fraktionierte Fällung durch Alkohol gewannen sie Invertinpräparate, von denen das beste den Zeitwert 3,5 aufwies. So dargestellt, enthält das Invertin sehr viel Hefegummi.

Wir waren durch die Zeitverhältnisse gezwungen, mit ungünstiger Hefe zu arbeiten (Zeitwert 350 bis 250). Die Isolierung des Invertins erfolgt im wesentlichen durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Eluieren und darauffolgende Adsorption mit Kaolin und nochmaliges Eluieren. Nach der ersten Elution entspricht das Invertin dem Zeitwert 5 bis 2,5, nach der zweiten Zeitwerten von 0,85 bis 0,55. Die Ausbeute betrug ungefähr ein Viertel vom Invertin der Hefe.

II. Verfahren der Adsorption mit Aluminimumhydroxyd.

1. Fraktionierte Adsorption.

Das Ausgangsmaterial war ein durch rasche Autolyse unter Toluolzusatz (1 Teil Hefe, 2 Teile Wasser) gewonnener Hefeauszug vom Zeitwert 250 (auf die Hefe bezogen). 14,75 l wurden mit 5,9 l, d. i. 40% Aceton vermischt und mit 1,5 kg gemahlenem Kaolin einige Minuten verrührt und über Nacht stehen gelassen. Dann konnte ein großer Teil der Flüssigkeit abgehebert werden, der Rest wurde filtriert. Bei dieser noch unvollkommenen Entfernung der Eiweißkörper gingen 10% des Invertins verloren. Vom Filtrat (16 l) diente ein Anteil von 2,7 l zur Bestimmung der [96] Tonerdemenge, die für die Adsorption von etwa 90% des Invertins erforderlich war, und die Hauptmenge (13,5 l; M.Z.Q. 52,3) wurde dann in fünf ebenso großen Anteilen mit Aluminiumhydroxyd bearbeitet. Von 8,3 g Aluminiumhydroxyd wurden in der Vorprobe 71% des Invertins adsorbiert; danach war vom Adsorbens etwa 20% mehr anzuwenden. Die 5 Portionen wurden mit Aluminiumhydroxydsuspension, für jede 10,7 g $Al(OH)_3$ enthaltend, in dünnem Strahl unter ständigem Umschütteln versetzt und eine halbe Stunde stehen gelassen. Das Adsorbens nahm nun 88% vom Invertin auf. Einfacher ist es, in der Vorprobe, die aber nicht viel kleiner genommen werden darf, zu bestimmen, wieviel Tonerde zur annähernd quantitativen Adsorption nötig ist und davon in der Hauptmenge 4/5 anzuwenden.

Vom Adsorbat läßt sich die Mutterlauge zum großen Teil dekantieren. Die übrig bleibende Suspension (4 l) verarbeiteten wir in einer Zentrifuge von gegen 2 l Gläserinhalt. In den Zentrifugengläsern wurde das gesammelte Adsorbat 3mal gewaschen durch Anrühren mit destilliertem Wasser und erneutes Zentrifugieren. Dann spülten wir das Tonerdeadsorbat in einen Kolben und versetzten die Suspension, deren Volumen 1700 ccm betrug, unter kräftigem Schütteln mit 5½ ccm 10proz. Ammoniak. Die rasch gebildete Elution wurde zum Teil auf einige Nutschen gegeben und auf gehärtetem Filtrierpapier abgesaugt, zum Teil in der Zentrifuge annähernd geklärt und auf die nämlichen Filter nachgefüllt, da die ammoniakalische Elution durch Zentrifugieren allein nicht klar erhalten und danach für sich allein nicht klar filtriert werden konnte. Auch das fast wasserklare Filtrat pflegte noch etwas kolloides Aluminiumhydroxyd zu enthalten, das erst bei starkem Einengen ausflockte. Die Arbeit muß so geleitet

werden, daß man in einem Tage bis zum Absaugen der Hauptmenge der Elution kommt, wenn auch nicht mehr zum Nachwaschen auf der Nutsche.

[97] Das Filtrieren der Elution würde durch Kieselgur oder Klärerde sehr erleichtert, aber dabei findet Verlust von Invertin durch Adsorption statt, bei der späteren Elution aus dem Kaolinadsorbat wird hingegen von Kieselgur kein Verlust bewirkt.

Die ammoniakalische Elution (1850 ccm) enthielt 47% vom Invertin (M.Z.Q. 24,8) des mit Kaolin behandelten Hefeauszuges. Sie wurde bei einer Destillationstemperatur von höchstens 25° unter starker Kühlung der Vorlage im Vakuum eingeengt und im Faust-Heimschen Trocknungsapparat vollends eingedampft. Dabei verminderte sich die Ausbeute auf 43% (M.Z.Q. 23,6).

Die in ein Becherglas oder in Zentrifugengläser übergespülte konzentrierte Lösung (40 ccm), die noch würzigen Hefegeruch und braune Farbe besaß, wurde unter Umrühren bei 0° mit dem gleichen Volumen von eiskaltem Aceton gefällt, in einer rasch an- und auslaufenden Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt und mit eiskaltem Aceton wieder in der Zentrifuge gewaschen. Diese Behandlung mit Aceton sollte nicht länger als etwa 5 Minuten dauern. Man brachte die bräunliche, krümelige Fällung rasch in den Exsiccator und evakuierte mit der Hochvakuumpumpe. Die Bestimmungen des getrockneten Präparates, 2,367 g vom Zeitwert 2,34, ergaben einen weiteren Rückgang der Ausbeute auf 38,6% (M.Z.Q. 20,3, Anh. Nr. 161).

In einigen Beispielen blieb die Ausbeute von der Gewinnung der Elution an bis zum trockenen Präparat konstant, häufiger traten aber, namentlich beim Fällen mit Aceton, Invertinverluste auf, die besonders bei den besten Präparaten die Ausbeute und den Reinheitsgrad erheblich beeinflußten. Dennoch war die Fällung mit Aceton nicht zu entbehren, bei welcher viel von den Begleitstoffen, beispielsweise $^3/_4$ der Menge des Invertinpräparates und noch mehr, in der Mutterlauge zurückblieb. Eine andere Verarbeitung desselben Hefeauszugs ergab 45% Ausbeute in der Elution (bezogen auf das [98] Invertin nach der Kaolinbehandlung) und lieferte ein Präparat vom Zeitwert 2,8 (Anh. Nr. 162). Eine weitere Autolysenflüssigkeit (13,5 l nach der Kaolinbehandlung) lieferte bei einer Ausbeute von 42% in der Elution 1,4 g Invertin vom Zeitwert 2,4. In diesem Falle war beim Eindampfen kein Verlust, aber beim Fällen mit Aceton Rückgang auf 26,7% vom Invertin des Hefeauszugs eingetreten (Anh. Nr. 163).

2. Vollständige Adsorption.

Man kann das Invertin auch quantitativ mit Aluminiumhydroxyd adsorbieren, aber dieses einfachere Verfahren, das wir öfters anwandten, führt nicht ebenso sicher zu den hohen Reinheitsgraden des Enzyms. Wir verarbeiteten z. B. Hefe vom Zeitwert 245 und behandelten 22 l Auszug (Zeitwert auf Hefe bezogen 282) unter Acetonzusatz mit Kaolin. In einer Probe des Filtrats ermittelten wir die Menge Adsorbens, bis 1 ccm Mutterlauge in 15 Minuten bei Einwirkang auf Rohrzuckerlösung unter Zusatz von $^1/_2$ ccm 20proz. Mononatriumphosphatlösung keinen reduzierenden Zucker

lieferte. Dann wurde aus dem gesamten Filtrat, 24 l, in vier Chargen das Invertin mit je 42,5 g Aluminiumhydroxyd vollständig adsorbiert. Das mittels der Zentrifuge abgetrennte und ausgewaschene Adsorbat schlämmten wir in 1 l Wasser an und bewirkten mit 4 ccm 10proz. Ammoniak die Elution, welche 50% vom Invertin des Hefeauszugs enthielt. Beim Eindampfen trat keine Abnahme ein, beim Fällen und Isolieren aber Rückgang auf 36%. Die Ausbeute betrug 5,42 g, der Zeitwert 3,3 (Anh. Nr. 164).

In einem anderen Beispiel lieferten 35 l mit Kaolin vorbehandelter Hefeauszug mit einer Ausbeute von 40% 13,1 g Invertin vom Zeitwert 5,5 (Anh. Nr. 165). In weiteren Fällen wurden Präparate vom Zeitwert 2,0 und 4,4 erhalten (Anh. Nr. 166 und 167).

[99] 3. Verarbeitung gealterter Autolysenflüssigkeit.

Besonders einfach und günstig gestaltete sich die Verarbeitung von Hefeauszügen, die lange Zeit aufbewahrt wurden. Die Fortdauer proteolytischer Vorgänge scheint zu bewirken, daß der Hefeauszug an Begleitstoffen, die dem Invertin anhaften, namentlich an höheren Proteinen, ärmer wird. Solche gealterte Autolysenflüssigkeit bedarf keiner Vorbehandlung mit Kaolin; in ihr würde auch zuviel Invertin vom Kaolin bei der Anwendung in acetonhaltiger Flüssigkeit adsorbiert.

Wir verarbeiteten Anfang November 1919 einen Ende März dargestellten und von der Hefe abfiltrierten Auszug vom Zeitwert 400 (auf Hefe bezogen). 10 l des Extraktes wurden mit 4 l Aceton vermischt, wobei ungewöhnlich wenig Eiweißfällung auftrat, und nach dem Filtrieren mit Aluminiumhydroxyd behandelt. Hier genügte ein Drittel der gewöhnlich für ebenso viel Invertin anzuwendenden Menge, nämlich 11,3 g, zum quantitativen Adsorbieren des Invertins. Die ammoniakalische Elution enthielt nach dem Einengen etwa 40%, aber das mit Aceton gefällte und getrocknete Präparat nur noch etwa 25% vom Invertin des Hefeauszugs. Die Ausbeute betrug 0,426 g, der Zeitwert (nach der teilweisen Zersetzung) 1,0 (Anh. Nr. 168).

Ein anderer, gleichfalls 7 Monate alter Hefeextrakt (Zeitwert 350) lieferte aus 5 l mit einer Ausbeute von 57% 1,24 g Invertin vom Zeitwert 2,5 (Anh. Nr. 169). Von einem ähnlichen, dritten Autolysensaft ergaben 7 l mit einer Ausbeute von 30% 0,95 g Invertin vom Zeitwert 2,8 (Anh. Nr. 170).

III. Adsorption mit Kaolin.

Das Invertin in der ammoniakalischen Elution aus dem Tonerdeadsorbat wird von Kaolin vollständig aufgenommen. Die erforderliche Kaolinmenge ist aber weit geringer, und der Reinheitsgrad des Invertins läßt sich höher steigern, wenn wir zuerst die Elution einengen [100] und mit Aceton fällen. Der Adsorption mit Kaolin wird das Invertin am besten in schwach essigsaurer Lösung unterzogen.

Wir verarbeiteten 3,83 g Invertin vom Zeitwert 4,8 (M.Z.Q. 16,3). Das Präparat wurde mit wenig Wasser angerieben und in 100 ccm gelöst. Die trübe Flüssigkeit

gab nach dem Filtrieren auf Zusatz von 2,5 ccm 2n-Essigsäure, und noch mehr beim Stehen, flockige Niederschläge, die starke Xanthoproteinreaktion zeigten. Nach wiederholtem Filtrieren enthielt die Lösung noch 8% des angewandten Invertins (M.Z.Q. 13,6). Unter Verdünnen auf 800 ccm bewirkten wir die vollständige Adsorption mit 83 g Kaolin, das mit kochender Salzsäure vorbehandelt war (vgl. Kap. B, Abschnitt VI). Das Adsorbat wurde sogleich in der Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt, worin hauptsächlich Hefegummi zurückblieb, und mehrmals mit Wasser gewaschen. Dann suspendierten wir es mit 1 l Wasser und fügten unter Schütteln 0,2n-Sodalösung bis zur eben beginnenden alkalischen Reaktion hinzu, wofür 11 ccm erforderlich waren. Das Natriumcarbonat wird vom Kaolin aufgenommen, das dabei das adsorbierte Enzym freigibt. Die mittels der Zentrifuge vom Kaolin getrennte Lösung war ganz trüb, sie wurde durch Schütteln mit Kieselgur (50 bis 100 g) klar und ohne Verlust filtrierbar. Die Elution enthielt 68% (M.Z.Q. 9,25) vom angewandten Invertin (der filtrierten Lösung) und ihr Gehalt blieb bei den folgenden Operationen (Eindampfen und Dialyse) konstant, was bei anderen Beispielen nicht der Fall war.

Die mit Essigsäure ganz schwach angesäuerte Elution wurde im Faust-Heimschen Trockenapparat bei 35 bis 40° Windtemperatur auf 300 ccm eingeengt und von dem dabei auftretenden kaolinähnlich aussehenden Niederschlag unter Zusatz von Kieselgur abfiltriert. Dann unterwarfen wir die Lösung einer dreitägigen Dialyse in Fischblasen (M.Z.Q. danach wieder 9,25) und dampften sie im Faust-Heim-Apparat in einem Schälchen aus [101] böhmischem Glas zur Trockne ein. Das Invertin (0,383 g, eine spröde, pulverisierbare Masse) wies den Zeitwert 0,86 auf (M.Z.Q. 9,20, Anh. Nr. 171).

Ein zweites Beispiel für die Reinigung mit Kaolin ist die Verarbeitung von 0,92 g (M.Z.Q. 6,50) eines Invertinpräparates, dessen Zeitwert 2,8 betrug. Die mit 0,1proz. Ammoniak bereitete Kaolinelution erfuhr bis zum vollständigen Abdampfen keine Einbuße an enzymatischer Wirksamkeit. Die Ausbeute betrug 64%, das Präparat (0,181 g) hatte den Zeitwert 0,855 (M.Z.Q. 4,22). In der Mutterlauge von der Kaolinbehandlung waren 0,51 g Substanz, hauptsächlich Hefegummi, zurückgeblieben. Die Adsorption war selektiv, aber nicht die Elution (Anh. Nr. 172).

Die Elutionsausbeute war in anderen Fällen weniger günstig. Aus 17,62 g Invertin vom Zeitwert 4,7 (M.Z.Q. 75) stellten wir mit 270 g Kaolin das Adsorbat dar und eluierten es mit 1,8 l Wasser unter Zusatz von 80 ccm 0,2n-Natriumcarbonat. Die mit Kieselgur geklärte, auf Lackmus neutral reagierende Elution (M.Z.Q. 30) enthielt 40% des Invertins, das beim Einengen und mehrtägigen Stehen auf 31% (M.Z.Q. 23) zurückging. Von da an war das Invertin beständig, auch bei sehr langem Stehen seiner Lösung. Die Hälfte der Ausbeute wurde 6 Tage lang dialysiert und eingedampft. Wir erhielten daraus 0,41 g trockenes Präparat, für das sich der Zeitwert 0,725 berechnete (Anh. Nr. 173).

Wenn bei einem solchen Präparat ein besonders günstiger Reinheitsgrad erzielt wurde, so ging damit geringere Beständigkeit Hand in Hand. Wir gingen von 4,4 g Invertin vom Zeitwert 2,57 aus (M.Z.Q. 34,2), das beim Auflösen in 2 l, Ansäuern

mit etwa 20 ccm 2n-Essigsäure und Filtrieren eine Einbuße von etwa 6% erlitt (M.Z.Q. 32,0). Die Adsorption mit 73 g Kaolin war quantitativ, die Elution mit 2 l Wasser unter Anwendung von 40 ccm 0,2n-Sodalösung enthielt nach dem Filtrieren, Klären und Einengen auf 300 ccm [102] (M.Z.Q. 15,3) 48% vom angewandten Invertin (auf die filtrierte Lösung bezogen). In der bei 2tägiger Dialyse erhaltenen Invertinlösung (M.Z.Q. nur noch 11,0), deren Trockenrückstand 0,368 g betrug, besaß das Invertin den Zeitwert 0,67, während man ohne die Zersetzung bei der Dialyse 0,5 erreicht hätte. Ein Teil der Ausbeute, 0,227 g (M.Z.Q. 5,23) wurde wieder gelöst und weitere 9 Tage dialysiert und zwar nun mit sehr geringem Verlust (M.Z.Q. 5,13). Darauf entsprach das Invertin nach der Wirksamkeit der Lösung und ihrem Trockengewicht (0,142 g) dem Zeitwert 0,55. Bei abermaligem Abdampfen wurde indessen ein Präparat gewonnen, dessen Zeitwert wieder auf 0,85 angestiegen war (M.Z.Q. 3,33, Anh. Nr. 174).

IV. Über Reinheitsmerkmale und Beständigkeit.

Die Beschreibung und Analyse des nach den Adsorptionsmethoden gewonnenen Invertins wird den Gegenstand einer folgenden Abhandlung bilden. Hier sollen nur diejenigen Eigenschaften der Invertinpräparate angeführt werden, die ihren Verunreinigungen zuzuschreiben sind.

Das nur mittels der Tonerdeadsorption gereinigte Invertin vom Zeitwert 5 bis 2 enthält viel Hefegummi, gibt daher beim Erwärmen mit Fehlingscher Lösung einen zähen, sich zusammenballenden Niederschlag und bildet bei 10 Minuten langem Kochen mit 20proz. Salzsäure reduzierenden Zucker. Das gleichartig gewonnene Präparat vom Zeitwert 1,0 war an Hefegummi arm, die weiter durch Adsorption mit Kaolin gereinigten Präparate frei davon.

Ferner gaben fast alle nach dem Tonerdeverfahren dargestellten Präparate noch Eiweißreaktionen, allerdings nur recht schwach, auf geringe Verunreinigung hindeutend, so die Millonsche Reaktion und die Ninhydrinprobe, während die Biuretreaktion fast immer negativ ausfiel. Nach der zweiten Adsorption bleiben die [103] Eiweißreaktionen ganz aus. Nur eine Art von Xanthoproteinreaktion kommt nie zum Verschwinden. Die Präparate bleiben beim Erhitzen in 0,3- bis 1proz. Lösung mit Salpetersäure farblos, zeigen aber beim Übersättigen mit Alkali eine rein gelbe, nicht intensive Farbe.

Das Invertin aus Tonerdeadsorbat liefert eine phosphorreiche Asche, es enthält ferner Ammoniumsalze und zeigt beim Erhitzen schwache Pyrrolreaktion. Es gibt Fällungen mit Pikrinsäure, mit Quecksilberchlorid, mit Bleiessig und auch mit Bleizucker. Dagegen wurde das Invertin vom Zeitwert 0,72 bis 0,85 in 0,2proz. Lösung nicht mehr von Quecksilberchlorid und nicht von Uranylacetat gefällt. Mit basischem Bleiacetat gab es noch eine starke Fällung, mit Bleizucker einen schwachen Niederschlag. Als wir von diesem mit Hilfe von Kieselgur abfiltrierten, blieben im Niederschlag 78% vom Enzym, und das Filtrat gab dann selbst mit basischem Bleiacetat

keine Fällung mehr. Auch diese Reaktion scheint also auf Verunreinigung zu beruhen.

Gang der Invertinwirkung beim Trocknen. Die Invertinwirkung zeigt eine noch eingehend zu untersuchende, merkwürdige Abhängigkeit vom Wassergehalt. Der Zeitwert eines Invertinpräparates stieg beim Aufbewahren im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd von 7,2 auf 12,0 an (bezogen auf gleiches Trockengewicht), verbesserte sich beim Stehen an der Luft auf 8,8, erhob sich bei monatelangem Aufbewahren über Phosphorpentoxyd im Vakuum wieder zu 16,3, um an der Luft unter Aufnahme von 6,3% Wasser wieder zu 8,0 zurückzukehren. Ein anderes Präparat verlor auch im Vakuum über Phosphorpentoxyd an Wirksamkeit, ohne sich aber an der Luft so weitgehend wie das erste zu erholen. Hier bewegte sich der Zeitwert beim Trocknen von 4,4 bis 7,2 und an der Luft unter Aufnahme von 11,3% Wasser, die bei der Bestimmung berücksichtigt sind, bis 5,9 zurück (Anh. Nr. 175 und 176).

Beständigkeit in Lösungen. Ein Präparat vom Zeitwert 7 blieb beim Aufbewahren in 0,2proz. Lösung [104] ohne Toluol im Meßkolben während 3 Wochen konstant, verlor aber in 1½ Jahren seine Wirksamkeit gänzlich (Anh. Nr. 177). Weniger beständig schien eine schwach essigsaure Lösung zu sein. Mehrere mit Aluminiumhydroxyd gereinigte Präparate wurden in 0,025n-Essigsäure geprüft; eines vom Zeitwert 4 verlor in 14 Tagen 28, ein zweites vom Zeitwert 2,4 in 14 Tagen 60, in abermals 14 Tagen weitere 16%, ein drittes vom Zeitwert 3,2 in den ersten 2 Wochen 22, in darauffolgenden 2 Wochen 0% der Wirkung (Anh. Nr. 178). Die 0,2proz. Lösung eines aus Kaolinadsorbat erhaltenen Invertins vom Zeitwert 0,725 behielt im Jenaer Kolben, in einer silbernen Flasche und im gewöhnlichen Meßzylinder während 2 bis 5 Tagen konstante Wirkung (Anh. Nr. 179).

Bei vorsichtigem Eindampfen nach verschiedenen Verfahren beobachteten wir in zahlreichen Versuchen ohne Regelmäßigkeit Abnahme oder Konstanz des Invertins. Im Abschnitt III wurde z. B. ein Präparat vom Zeitwert 0,55 angeführt, das beim Abdampfen von 300 ccm Lösung zur Trockne um 35% an Wirkung verlor. Dagegen konnte eine andere Darstellung von Invertin aus Kaolinadsorbat (Zeitwert 0,86) von 1 l Volumen bis zur Trockne ohne Verlust eingedunstet werden.

Schädigung durch organische Lösungsmittel[1]. Die Hemmung der Invertinwirkung durch Alkohol haben C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON[2] und später C. S. HUDSON und H. S. PAINE[3] beobachtet, die auch die Schädigung des Enzyms genauer untersuchten. Nach HUDSON und PAINE bewirkt bei 30° 50proz. Alkohol maximale Schädigung, bei größerer Alkoholkonzentration nimmt die Schädigung ab, Alkohol unter 20% wirkt nicht zerstörend.

[105] Wie Alkohol, so zeigt auch Aceton zugleich hemmende und schädigende Wirkung auf Invertin. Die Hemmung finden wir nicht wesentlich abhängig vom Reinheitsgrad. Dagegen zeigte sich, daß die schädigende Wirkung von Alkohol und Aceton

[1] Die Versuche dieses Abschnitts hat Frl. Dr. G. OPPENHEIMER ausgeführt, der wir für ihre freundliche Unterstützung bestens danken.

[2] Journ. chem. soc. **57**, 834, 927 [1890].

[3] Journ. Am. chem. soc. **32**, 1350 [1910].

vom Reinheitsgrad des Invertins in hohem Grade abhängt. Die Begleitstoffe in den Hefeauszügen üben auch hier eine schützende Wirkung aus. Das reinere Invertin der aus Tonerdeadsorbat dargestellten Elution unterliegt schon in viel höherem Maße der Zerstörung durch die organischen Solvenzien.

Diese schädigende Wirkung beobachteten wir auf zwei Weisen. Man kann, wie Hudson und Paine in ihren genauen Messungen, die Abnahme der Wirkung sofort und nach einer gewissen Einwirkungsdauer bestimmen; aus der Differenz ergibt sich die Zerstörung, die neben der Hemmung einhergeht. Dabei wirkt das organische Lösungsmittel jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen schädigend und hemmend, da die Invertinlösung mit einem gewissen Prozentbetrag von Alkohol oder Aceton versetzt und für die Bestimmung durch Rohrzuckerlösung auf einen niedrigeren Gehalt an organischem Lösungsmittel verdünnt wird. Die angewandten Hefeauszüge waren infolge von Behandlung mit Kaolin arm an Eiweißstoffen. Sie wurden durch Zusatz von Alkohol und Aceton auf einen Gehalt von 30 oder 50% Alkohol und 28 oder 50% Aceton gebracht. Diese Konzentrationen waren entsprechend der beginnenden und der vollständigen Ausfällung des Invertins gewählt. Von dem bei Zimmertemperatur mit dem Lösungsmittel versetzten Hefeauszug wurde entweder sofort oder nach längerer Einwirkung eine Probe von 20 ccm zu 50 ccm 32proz. Rohrzuckerlösung und 5 ccm Mononatriumphosphat gegeben und auf 100 ccm aufgefüllt. Das in 30- oder 50proz. Lösung schädigend wirkende Solvens übt also die hemmende Wirkung in 6- und 10proz. Lösung aus. Die Genauigkeit [106] der Messungen war geringer als bei der Mehrzahl unserer Bestimmungen in wäßrigen Lösungen.

Wie die Tab. 26 zeigt, bewirkt Alkohol schon in niedrigerer Konzentration als Aceton eine bedeutende Hemmung. Die Schädigung durch Aceton ist ähnlich wie durch Alkohol, sie ist in der Elution aus Tonerdeadsorbat größer als in Hefeextrakten.

Tabelle 26. Invertinwirkung bei Gegenwart organischer Lösungsmittel.

	Prozentgehalt in der Invertinlösung	Prozentgehalt in der Bestimmungsflüssigkeit	Dauer der Einwirkung vor der Bestimmung	Nulldrehungszeit	Abnahme der Invertinwirkung Proz.	Zerstörung des Invertins Proz.
Hefeauszug				39		
Mit Alkohol	30	6	0	63	38	
„	30	6	24 Stunden	66	41	5
„	50	10	0	59	34	
„	50	10	24 Stunden	66	41	11
„ Aceton	28	5,6	0	42	7	
„	28	5,6	24 Stunden	45	14	7
Elution	—			75		
Mit Aceton	50	10	0	87	13	
„ „	50	10	24 Stunden	427	83	77

Unabhängig von der hemmenden Wirkung bestimmten wir die Zerstörung durch Alkohol und Aceton nach einem zweiten Verfahren (Tab. 27 und 28). Teils sofort nach dem Versetzen mit dem Solvens, teils nach einer gewissen Einwirkungszeit wurde im Vakuum bei einer Badtemperatur von höchstens 45° und unter starker Kühlung

der Vorlage das organische Lösungsmittel rasch und vollständig abdestilliert und die Invertinlösung im Meßkolben wieder auf ihr ursprüngliches Volumen gebracht. Im Fall des sofortigen Abdestillierens (Einwirkungsdauer „kurz" in den beiden Tabellen) vergingen 2 Minuten bis zum Beginn, etwa 30 bis zur Beendigung [107] der Destillation.

Tabelle 27. Schädigung des Invertins im Hefeauszug.

Organisches Lösungsmittel	Einwirkungsdauer	Nulldrehungszeit	Verlust an Invertin Proz.
		39	0
Alkohol, 30proz.	kurz	39	0
„ 50 „	„	39	0
Aceton, 28 „	„	39	0
„ 50 „	„	41	5
		57	0
Alkohol, 30proz.	kurz	56	0
„ 30 „	24 Stunden	61	7
„ 50 „	kurz	59	3
„ 50 „	24 Stunden	66	14
„ 50 „	6 Tage	88	35
Aceton, 28 „	kurz	56	0
„ 28 „	24 Stunden	62	8
„ 50 „	kurz	59	3
„ 50 „	24 Stunden	65	12

Tabelle 28. Schädigung des Invertins in Elution aus Tonerdeadsorbat.

Organisches Lösungsmittel	Einwirkungsdauer	Nulldrehungszeit	Verlust an Invertin Proz.
		48	0
Alkohol, 30proz.	kurz	59	18
„ 30 „	24 Stunden	181	74
„ 50 „	kurz	94	49
„ 50 „	24 Stunden	463	90
Aceton, 28 „	kurz	62	23
„ 28 „	24 Stunden	1000	96
„ 50 „	kurz	63	24
„ 50 „	24 Stunden	1175	96

In den Tab. 27 und 28 sind einige Versuche angeführt, welche die viel größere Empfindlichkeit des gereinigten Invertins veranschaulichen.

[108—135]

Anhang. Versuchsbelege.

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
1	a) Hefe, frisch, 21,3proz.	0,5 g	57,5	9,42	167	350
			86	5,03	162	
	b) Hefe, zerrieben . . .	0,5 g	58	9,33	165	352
2	a) Hefe, frisch, 20,5proz.	0,5 g	48,5	10,02	156	310
			75	6,27	147	
	b) Hefe, zerrieben . . .	0,5 g	47	9,07	151	314
			73	6,63	150	
	c) Dieselbe, nach 2 Tagen	0,5 g	54	9,03	148,5	308
			75	6,50	140,5	
3	a) Hefe, frisch, 21proz. .	0,5 g	62	8,04	149	312
			91	4,52	148	
3	b) Hefe, zerrieben	0,5 g	49	9,48	144	310
			63,5	7,67	146	
4	a) Hefe, frisch, 20,8proz.	0,5 g	48,5	10,30	165	340
			76,5	6,96	162	
	b) Hefe, zerrieben . . .	0,5 g	49,5	10,88	186	300
			76,5	7,82	178	
	c) Dieselbe, nach 3 Tagen	0,5 g	75,5	7,33	164	355
			101	4,86	171	
5	a) Hefe, frisch, 21,1proz.	0,25 g	152	5,82	284	300
	b) Hefe, trocken	0,3 g	37	6,0	71,5	430
			58	2,25	74,5	

Nr	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 dm Rohr	[illegible]zeit	Mittelwert
[illegible] a	Hefe, frisch, 2[illegible]proz.	0,5 g	[illegible]	4,[illegible]	147	288
			117,8	1,[illegible]	1[illegible]	
b	Hefe, 3/4 Std. zerrieben	0,1 g	40,8	12,[illegible]	2[illegible]	478
			65,8	1,71	2[illegible]	
c	Hefe, 1 1/4 Std. zerrieben	0,1 g	[illegible]	8,4[illegible]	1[illegible]	[illegible]
			8[illegible]	6,2[illegible]	174	
[illegible] a	Hefe, frisch, 2[illegible]proz.	0,5 g	55,8	6,88	118	[illegible]
			72,8	4,5[illegible]	118	
b	Hefe, 3/4 Std. zerrieben	0,2 g	43	4,80	72[illegible]	[illegible]
c	Hefe 2 3/4 Std. zerrieben	0,1 g	80	[illegible]	1[illegible]	288
[illegible] a	Hefe, frisch, [illegible]proz.	0,5 g	54,8	[illegible]	182	[illegible]
			73,8	6,52	184	
b	Hefe, 3/4 Std. zerrieben	0,1 g	75	7,07	18[illegible]	36[illegible]
			77	5,58	18[illegible]	
c	Hefe, 2 Std. zerrieben	0,1 g	82	6,68	1[illegible]	[illegible]
			228	2,28	158	
[illegible]	Hefe, frisch	0,5 g	8[illegible] a			2[illegible]
[illegible]	Hefe 3/4 Std. zerrieben	0,2 g	4[illegible]	4,58	76[illegible]	[illegible]
			64	1,88	7[illegible]	
c	Hefe, 2 3/4 Std. zerrieben	0,1 g	125	[illegible]18	12[illegible]	[illegible]
[illegible] a	Hefe nicht bestimmt					ca. 250
b	Hefeauszug nach 4 Std.	5 ccm	124	15,[illegible]	212[illegible]	8[illegible]
			1162	10,8[illegible]	42[illegible]	
[illegible]	Hefeauszug nach 48 Std.	5 ccm	[illegible]	7,[illegible]	231[illegible]	[illegible]
[illegible] a	Hefe, nicht bestimmt					ca. 250
b	Hefeauszug nach 8 Std.	5 ccm	[illegible]	13,8[illegible]	2[illegible]	14[illegible]
	nach 36 Std.	5 ccm	[illegible]	1[illegible]	1[illegible]	12[illegible]
d	Hefeauszug bei 25°	5 ccm	81	1[illegible],31	[illegible]	2[illegible]
			242	4,4[illegible]	[illegible]	
[illegible] a	Hefe, frisch, siehe 8a					[illegible]
b	Hefe, trocken	0,1 g	6[illegible]	1[illegible]	[illegible]48	[illegible]
			8[illegible]	11,2[illegible]	374	
14 a	Hefe, frisch, nicht bestimmt					ca. 2[illegible]
b	Hefeauszug bei 2[illegible]°	5 ccm	2[illegible]	14,72	2[illegible]	16[illegible]
c	Hefeauszug bei 3[illegible]°	5 ccm	28[illegible]	1[illegible]	1[illegible]	12[illegible]
1[illegible] a	Hefe, frisch, nicht bestimmt					ca. 2[illegible]
b	Hefeauszug	5 ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]48	16[illegible]
1[illegible] a	Hefe, frisch, siehe 1[illegible]a					3[illegible]
b	Hefeauszug, 10 g Hefe mit 1[illegible] ccm Wasser	5 ccm	6[illegible]	12,2	342	3[illegible]
17 a	Hefe, frisch, nicht bestimmt					ca. 2[illegible]
b	Hefeauszug, 10 g Hefe mit 150 ccm Wasser	5 ccm	2[illegible]	4,[illegible]	[illegible]24	2 2[illegible]
1[illegible]	Heferückstand, aus 10 g Trockenhefe zu [illegible] ccm aufgeschlämmt	5 ccm	41	12,92	234	1[illegible]
			66,8	1[illegible],47	2[illegible]	
1[illegible] a	Hefe, frisch, nicht bestimmt					ca. 2[illegible]
b	Hefeauszug	5 ccm	18	1[illegible],7	1[illegible]	ca. 2[illegible]
			151	2,22	1[illegible]	
2[illegible] a	Hefe, frisch, 20,2proz.	0,25 g	72	11,8[illegible]	328	
			97	10,72	[illegible]	
			11[illegible]	8,72	2[illegible]	[illegible]
			1[illegible]	[illegible]	284	
b	Hefeauszug n. 24 Std., 10 g Trockenhefe mit 1[illegible] ccm Wasser	5 ccm	5[illegible]	11,88	[illegible]79	17[illegible]
			7[illegible]	1[illegible]	26[illegible]	
c	Hefeauszug n. 14 Tagen	5 ccm	48	4,8[illegible]	82	[illegible]
21 a)	Hefe, frisch, 22proz.	0,25 g	15	15,8	2[illegible]	27[illegible]
			[illegible]	1[illegible],8	225	
b)	Hefeauszug, 10 g Hefe mit 150 ccm Wasser	5 ccm	40	11,78	18[illegible]	12[illegible]
			1[illegible]	1,51	18[illegible]	
22 a)	Hefe, frisch, nicht bestimmt					ca. 2[illegible]
b)	Hefeauszug aus 10 g Trockenhefe mit 150 ccm Wasser nach 24 Std.	5 ccm	30	5,48	[illegible]	[illegible]
c)	Derselbe, nach 7 Tagen	5 ccm	49	1,[illegible]	46	3[illegible]
23 a	Hefe, frisch, nicht bestimmt	—	—	•	—	ca. 2[illegible]
b)	Hefeauszug, aus 50 g Hefe mit 400 ccm Wasser	5 ccm	6	11,2[illegible]	2[illegible],6	328
24 a)	Hefe, nicht bestimmt	—				ca. 2[illegible]

Nr	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 dm Rohr	[illegible]zeit	Mittelwert
24 b)	Hefeauszug [illegible] g Hefe mit 1[illegible] ccm Wasser	[illegible]	[illegible]	4,[illegible]	4[illegible]	[illegible]
25 a	Hefe, frisch, siehe 24a					[illegible]
b	Hefeauszug, [illegible] g Hefe mit [illegible] ccm Wasser	[illegible]	4	[illegible]	[illegible]	4[illegible]
26 a	Hefe, frisch, siehe [illegible]					[illegible]
b)	Hefeauszug, 1[illegible] g Hefe mit 1[illegible] ccm Wasser nach 24 Std.	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1[illegible]
			8[illegible]	1,[illegible]	[illegible]	
c	Derselbe nach 8 Tagen	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	1[illegible]	[illegible]	
27 a)	Hefe, frisch, siehe 1[illegible]a					[illegible]
b	Hefeauszug, 1[illegible] g Hefe mit 1[illegible] ccm Wasser	[illegible] ccm	[illegible]	7,68	84	4[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
28 a	Hefe, frisch, siehe [illegible]					[illegible]
b	Hefeauszug, 1[illegible] g Hefe mit 1[illegible] ccm Wasser nach [illegible] Tagen	[illegible] ccm	41	[illegible]58	1[illegible]	[illegible]
			[illegible]	4,8[illegible]	1[illegible]	
c	Derselbe, nach [illegible] Tagen	[illegible] ccm	41,8	6,[illegible]	81	1[illegible]
			[illegible]	1,[illegible]	81	
29 a	Hefe, frisch, [illegible]proz.	5 g	28,8	2,[illegible]	122	[illegible]
			1[illegible]	4,[illegible]	1[illegible]	
b	Hefeauszug [illegible] g Hefe mit 1[illegible] ccm Wasser	2,5 ccm	1[illegible]	[illegible]	1[illegible]	[illegible]
			[illegible]	48	1[illegible]	
30 a	Hefe frisch, siehe [illegible]					[illegible]
b	Autolysensaft	[illegible] ccm	14	4,[illegible]	[illegible]	[illegible]
31 a	Hefe, siehe [illegible]					[illegible]
b	Hefeauszug	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	4[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	4[illegible]	
32 a	Hefe [illegible]proz.	[illegible] g	[illegible]	1[illegible]	188	[illegible]
			1[illegible]	4,[illegible]	127	
b)	Hefeauszug	[illegible] ccm	12	4,8[illegible]	[illegible]	[illegible]
			27	[illegible]8	[illegible]	
33 a)	Hefe, [illegible]proz.	[illegible] g	67	12,14	2[illegible]	4[illegible]
			[illegible]	1[illegible]	1[illegible]	
b)	Hefeauszug	[illegible] ccm	[illegible]	1,[illegible]	41	[illegible]
			74	[illegible]	[illegible]	
34 a)	Hefe [illegible]proz.	[illegible] g	66	8,18	114	[illegible]
b)	Hefeauszug	2,5 ccm	6[illegible]	1,74	74	[illegible]
35 a)	Hefe, [illegible]proz.	[illegible] g	47	7,[illegible]	11[illegible]	[illegible]
b)	Hefeauszug	2,5 ccm	88	1,[illegible]	[illegible]	[illegible]
36 a)	Hefe, 1[illegible]proz.	[illegible] g	49	[illegible]	174	[illegible]
			7[illegible]	7,[illegible]	1[illegible]	
b)	Hefeauszug	2,5 ccm	[illegible]	[illegible]	7[illegible]	41[illegible]
			6[illegible]	[illegible]	6[illegible]	
37 a)	Hefe, 21,[illegible]proz.	[illegible] g	48	[illegible]	143	[illegible]
b)	Hefeauszug	2,5 ccm	[illegible]	6,[illegible]	61,8	[illegible]
			6[illegible]	[illegible]8	6[illegible]	
38 a)	Hefe, [illegible]proz.	[illegible] g	4[illegible]	11,47	107	[illegible]
b)	Hefeauszug	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]77	74	[illegible]
			44	[illegible],78	[illegible]	
39 a)	Hefe, 21,4proz.	[illegible] g	41	11,[illegible]	[illegible]8	4[illegible]7
			[illegible]	11,[illegible]	[illegible]	
b)	Hefeauszug	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]44
			4[illegible]	[illegible]	[illegible]	
40 a)	Hefe, 21,[illegible]proz.	[illegible] g	[illegible]	1[illegible]	148	[illegible]7
			6[illegible]	7,8[illegible]	1[illegible]	
b)	Hefeauszug	[illegible] ccm	[illegible]	8,[illegible]	[illegible]	[illegible]
			4[illegible]	[illegible],8[illegible]	6[illegible]	
41 a)	Hefe [illegible]proz.	[illegible] g	44	1[illegible],48	[illegible]86	6[illegible]
			6[illegible]	11,[illegible]	[illegible]85	
b)	[illegible] g Hefe und [illegible] ccm H_2O	2,5 ccm	44	7,4[illegible]	7[illegible]	41[illegible]
c)	[illegible] g Hefe und [illegible] ccm H_2O	1[illegible] ccm	8[illegible]	4,[illegible]	149	[illegible]
42	Hefe frisch, siehe [illegible] Versuch bei [illegible]					[illegible]
	a) 21 Stunden	[illegible] ccm	43	14,[illegible]	[illegible]	2800
			[illegible]	11,71	433	
	b) 4 Tage	5 ccm	4[illegible]	1,6[illegible]	[illegible],7	[illegible]
			6[illegible]	1,5[illegible]	[illegible]	
	c) 6 Tage, siehe 31					3[illegible]4
	d) 8 Tage	5 ccm	[illegible]	1,40	45,7	[illegible]
			[illegible]	0,68	46,[illegible]	

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 dm-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
42	Versuch bei 36°.					
	a) 21 Stunden	5 ccm	45	6,18	88	635
			65	2,50	86	
	b) 4 Tage	5 ccm	46	2,08	59	425
	c) 6 Tage	5 ccm	29	5,72	54,5	300
			38	3,14	53,5	
	d) 8 Tage	5 ccm	41	2,30	53,5	390
			56	0,32	58	0
43	a) Hefe, frisch, siehe 21a					276
	b) nach 26¼ Stunden	5 ccm	33	8,48	83,[illegible]	770
			78	1,26	90,5	
	c) nach 4 Tagen	5 ccm	32	2,61	42,7	350
			50	1,40	41	
44	a) Hefe, siehe 21a					276
	b) nach 26¼ Stunden	5 ccm	33	15,28	354	3320
			126	9,98	391	
45	a) Hefe, siehe 20a					300
	b) nach 24 Stunden	5 ccm	45	14,66	440	3400
			62	14,20	550	
46	a) bis d) sind 4 Parallelversuche aus derselben Hefe bei 20° und 0° mit und ohne Phosphat. Bestimmung der Hefe, 20,9proz	0,5888 g	59	8,13	145	
			71	6,11	145	355
			85	4,72	143	
	a) ohne Phosphat 0°	5 ccm	60,5	11,43	248	1870
			84,5	9,73	255	
	b) ohne Phosphat 20°					
	1. 24 Stunden	5 ccm	61,5	6,40	120	920
			88,7	3,50	128	
	2. 48 Stunden	5 ccm	55	1,02	62	450
			69	1,13	59,5	
	3. 72 Stunden	5 ccm	30	1,0	33,8	252
	c) mit Phosphat 0°.					
	24 Stunden	5 ccm	60,5	11,40	248	1870
			85,5	9,30	252	
	d) mit Phosphat 20°					
	1. 24 Stunden	5 ccm	62,2	1,85	75,3	560
			80	1,30	74	
	2. 48 Stunden	5 ccm	41,5	2,82	51,5	398
			58	0,43	52,5	
	3. 72 Stunden	5 ccm	33	1,20	53	105
47	a) bis d) wieder Parallelversuche. Hefe, 21,4proz	0,5743 g	73	8,18	132	328
			87	4,02	135	
	a) ohne Phosphat 0°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	31	14,24	278	2190
			60	12,20	290	
	2. 48 Stunden	5 ccm	41	10,92	154	1165
			68,5	7,18	150	
	b) ohne Phosphat 25°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	36,5	10,10	110	913
	2. 48 Stunden	5 ccm	38	5,72	64,6	493
			62	0,38	64	
	c) mit Phosphat 0°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	35	14,09	275	2078
			60	11,78	267	
	2. 48 Stunden	5 ccm	35	12,02	100	1210
			62,5	8,40	158	
	d) mit Phosphat 20°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	36	8,50	92,3	713
			60,5	4,10	94	
	2. 48 Stunden	2,5 ccm	54	7,36	118	458
			78	4,13	121	
48	Frische Hefe, 20,8proz	0,6458 g	70,5	5,48	123	318
			88	3,08	127,5	
	a) ohne Phosphat 0°	5 ccm	32,5	14,00	300	2240
			54,5	13,23	338	
	b) ohne Phosphat 25°					
	1. 24 Stunden	5 ccm	30,5	6,01	58	400
			54	0,38	56	
	2. 72 Stunden	5 ccm	44	1,40	51,5	358
			55	−0,72	50,0	
	c) mit Phosphat 0°	5 ccm	36	14,71	342	2450
			57,5	13,20	356	
48	d) mit Phosphat 20°.					
	1. 24 Stunden	5 ccm	25,5	6,34	50	390
			51,5	0,88	57,5	
	2. 72 Stunden	5 ccm	47,5	−0,10	45,7	322
49	Frische Hefe, 22,4proz	0,6139 g	95,5	1,03	107	235
	a) 4 Stunden	5 ccm	86	15,85	1205	10550
			109	15,62	1455	
	b) 22 Stunden	5 ccm	75,5	1,23	62,7	465
			117	4,00	57,5	
	c) 48 Stunden	5 ccm	40,7	1,9	30,1	244
50	a) Hefe, frisch, siehe 47					325
	b) 48 Stunden	5 ccm	27,7	2,88	38,9	291
			55	2,88	36,9	
	c) 72 Stunden	5 ccm	39	−0,23	37,7	232
51	a) Hefe, frisch, 20proz	0,501 g	44,5	10,78	173	318
			78	5,82	147	
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	27,5	4,60	48	300
			51,5	0,11	52	
52	a) Hefe, frisch, siehe 6a					288
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	58,5	0,08	59	357
53	a) Hefe, frisch, 21,2proz	0,5 g	55,5	6,58	118	200
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	40	1,47	32,4	131
54	a) Hefe, frisch, siehe 3a					312
	b) Hefeauszug	5 ccm	16,7	1,55	13,2	153
55	a) Hefe, frisch, 21,3proz	0,4531 g	49	9,91	154	207
			70	7,23	153	
	b) NH_3, Toluol	2,5 ccm	60	3,33	72	270
			63,5	1,12	72,5	
	c) Hudson, siehe 36b					413
56	Hefe, nicht bestimmt					ca. 240
	a) NH_3, Toluol	5 ccm	25	0,70	20	240
	b) Hudson	5 ccm	28	2,0	21	240
57	Hefe siehe 37a					305
	a) NH_3, Toluol	2,5 ccm	32	9,09	105	540
			61,2	4,52	108	
	b) Hudson, siehe 37b					309
58	Hefe, frisch, 20,9proz	0,5211 g	40	11,47	167	363
	a) NH_3, Toluol	5 ccm	44	2,78	24,7	223
	b) Hudson, siehe 38b					280
59	Hefe, siehe 34a					245
	a) NH_3, Toluol	2,5 ccm	34,5	2,40	44,5	268
	b) Hudson, siehe 34b					282
60	a) Hefe, siehe 6a					280
	b) nach Stehen	0,5 g	47	10,19	155	265
			60,5	8,43	153	
61	a) Hefe, frisch, siehe 41a					603
	b) nach ¾ Stunde	0,5 g	47	12,98	271	568
			64	11,58	267	
	c) nach 24 Stunden	0,5 g	74	10,40	253	535
			93	8,77	244	
62	a) Hefe, frisch, siehe 34a					248
	b) Toluol	0,5 g	61,5	3,30	91	165
	c) Essigester Toluol	0,5 g	58,5	4,10	92	194
63	a) Hefe, frisch, 21,5proz	0,5 g	52,5	7,51	120	258
	b) Hefeauszug, sofort	5 ccm	51	12,12	257	1960
			102	7,50	242	
	c) Hefeauszug mit Essigester, 4 Tage	2,5 ccm	33	14,51	318	1350
			46,5	14,00	360	
	d) Hefeauszug mit Toluol, 4 Tage	2,5 ccm	20,5	8,23	73	280
			41	5,32	72,5	
64	a) Hefe, frisch, 21,7proz	0,5 g	54,5	9,12	152	330
			73,5	6,90	154	
	b) ¼ Std. zerr. 50 g Hefe mit 100 g H_2O	5 ccm	124	2,80	167	1250
	c) 1 Std. zerr. 50 g Hefe mit 500 g H_2O	5 ccm	127,5	11,57	532	1080
			311	4,78	527	
65	a) Hefe, frisch, 20proz	0,5 g	64,5	0,38	181	350
			87	6,30	173	
	b) 50 g Hefe mit 200 g H_2O	5 ccm	128	2,25	163	690
			158	0,80	172	
	c) Hefeauszug mit Toluol, 4 Tage	2,5 ccm	77,5	1,82	94	340
			111	−1,41	90	

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 dm-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
[illegible]	d) Hefeauszug, 4 Tage mit Essigester	2,5 ccm	68	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	Die rückständige Hefe von [illegible] g Preßhefe wog [illegible] g mit Seesand. Also entsprechen [illegible] g [illegible] g Preßhefe					
	α) Heferückstand	0,5 g	44	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	14 [illegible]	[illegible]	
	β) Hefeauszug m. [illegible] ccm H_2O	2,5 ccm	47 [illegible]	[illegible]	124	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	Dabei ist zu beachten, daß dieser Hefe noch etwa [illegible] ccm Extrakt von d) anhaftete, so daß höchstens [illegible] des in β) bestimmten Invertins aus dem Heferückstand neu ausgezogen wurde					
[illegible]	a) Hefe, frisch, 21,6proz.	[illegible] g	114	1,43	[illegible]	[illegible]
			178	[illegible] 21	[illegible]	
	b) [illegible] Std. zerrieben [illegible] g Hefe mit 250 ccm H_2O	5 ccm	45	11 [illegible]	188	[illegible]
			117	4 [illegible]	[illegible]	
	c) [illegible] Std. zerrieben [illegible] g Hefe mit [illegible] ccm H_2O	5 ccm	[illegible]	12 [illegible]	186	[illegible]
			111	4 [illegible]	18[illegible]	
	d) Hefeauszug, 4 Tage mit Essigester	2,5 ccm	4[illegible]	12,[illegible]	181	4[illegible]
			[illegible]	[illegible]	181	
[illegible]	a) Hefe, frisch, siehe 41a					[illegible]
	b) [illegible] g Hefe, zerrieben mit [illegible] ccm H_2O	5 ccm	78	1[illegible] 4	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
[illegible]	a) Hefe, frisch, siehe 6a					[illegible]
	b) [illegible] g Hefe mit [illegible] g H_2O	5 ccm	[illegible]	[illegible]	1[illegible]	[illegible]
			1[illegible]	[illegible]	12[illegible]	
[illegible]	Hefe, frisch, siehe 7a					2,6
	a) [illegible] Std. zerrieben [illegible] g Hefe mit [illegible] g H_2O	5 ccm	128	[illegible]	[illegible]	42[illegible]
			148	[illegible]	[illegible]	
	b) [illegible] Std. zerrieben, [illegible] g Hefe mit [illegible] g H_2O	5 ccm	[illegible]	11,[illegible]7	1[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible] 11	1[illegible]	
7[illegible]	a) Hefe, frisch, siehe 8a					[illegible]
	b) [illegible] g Hefe mit [illegible] ccm H_2O	2,[illegible] ccm	48	11,[illegible]2	[illegible]	[illegible]7
			114,[illegible]	[illegible] 4[illegible]	[illegible]	
71	a) Hefe, frisch, siehe 7a und [illegible]					2,6
	b) [illegible] g Hefe mit [illegible] ccm H_2O	5 ccm	68,5	[illegible]	97	[illegible]
7[illegible]	Hefe, nicht bestimmt, siehe [illegible]				ca. [illegible]	[illegible]
	a) [illegible] Tage	5 ccm	31	7,4[illegible]	7[illegible]	8[illegible]7
			64	[illegible]	[illegible]	
	b) [illegible] Tage	5 ccm	[illegible]	4,[illegible]	[illegible]	64[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	c) Heferückstand: Unter der Annahme, daß [illegible] der Trockensubstanz der Hefe vorher extrahiert waren, wurde mit der rückständigen Hefe, die nunmehr 35,6% Trockenrückstand hatte, eine Bestimmung gemacht. Die [illegible] g entsprachen also ungefähr 1,75 g der ursprünglichen Hefe	0,5 g	42,[illegible]	11,[illegible]	1[illegible]	ca. 1[illegible]
			82,5	7,[illegible]	[illegible]	
7[illegible]	Hefe, frisch, siehe 17a					[illegible]
	a) Hefeauszug	5 ccm	32	1[illegible]	778	4[illegible]
			[illegible]	1[illegible]	78[illegible]	
	b) Die abfiltrierte Hefe v. ursprünglich 50 g Preßhefe mit ca. 200 ccm Wasser 3 Tage ausgezogen	5 ccm	49	16,52	22[illegible]	ca. 1[illegible]
			63,5	16,61	17[illegible]	
74	Hefe, frisch, siehe 58					[illegible]
	a) sauer	5 ccm	33,5	6,71	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	71	
	b) neutral	5 ccm	36,5	4,47	55,7	7[illegible]
	c) NH_3: 1. 3 Tage	5 ccm	51,5	2,28	[illegible]	442
	2. 5 Tage	5 ccm	47,5	0,77	42,7	[illegible]
75	a) Hefe, frisch, 19proz.	0,4711 g	45	11,91	207	417
			57	10,68	[illegible]	
	b) Essigester $CaCO_3$	5 ccm	26	[illegible]	46,2	[illegible]
			47	[illegible]	47	

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 dm-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
[illegible]	Hefe, frisch, [illegible]proz.	[illegible] g	[illegible]	12,[illegible]	[illegible]	4[illegible]
			[illegible]	[illegible]	194	
	a) MgO: 1. [illegible] Tage	5 ccm	[illegible]	14,1[illegible]	[illegible]	1[illegible]
	2. [illegible] Tage	5 ccm	[illegible]	[illegible]	248	[illegible]
	b) NH_3: 1. [illegible] Tage	5 ccm	[illegible]	[illegible]	214	[illegible]
	2. [illegible] Tage	5 ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	Hefe, frisch, 21,4proz.	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	[illegible]	41[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	a) $KHCO_3$: 1. [illegible] Tage	5 ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	2. [illegible] Tage	5 ccm	[illegible]	[illegible]	141	[illegible]
	b) CO_2: 1. [illegible] Tage	5 ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	11[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	2. [illegible] Tage	5 ccm	94	[illegible]	[illegible]	11[illegible]
	c) NH_3: 1. [illegible] Tage	5 ccm	[illegible]	14,[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	11,[illegible]	[illegible]	
	2. [illegible] Tage	5 ccm	41,[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	11,[illegible]	[illegible]	
	d) Heferückstand von c) [illegible]. Eine Extraktbestimmung ergab, daß [illegible] der Trockensubstanz der Hefe extrahiert waren, die abfiltrierte und abgepreßte Hefe hatte einen Trockenrückstand von 45%. Mithin entsprechen den angewandten [illegible] g extrahierter Hefe 1,[illegible] g ursprünglicher Preßhefe	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	4[illegible]	[illegible]
78	a) Hefe, frisch, siehe [illegible]a					[illegible]
	b) Hefeauszug	5 ccm	51,8	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	c) Der Rückstand v. [illegible] g extrahierter Preßhefe wurde [illegible] ccm aufgeschlämmt und bestimmt mit	[illegible] ccm	4[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	d) [illegible] Tage ausgezogen	5 ccm	[illegible]	11,[illegible]	[illegible]	[illegible]
			74,[illegible]	[illegible]	[illegible]	
79	a) Hefe, frisch, siehe [illegible]a					[illegible]
	b) Hefeauszug	[illegible] ccm	31	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			47	[illegible]	[illegible]	
80	Hefe, frisch, siehe 41a					[illegible]
	a) wenig Wasser	5 ccm	[illegible]	14,[illegible]	[illegible]	[illegible]
	b) 10faches Wasser	10 ccm	[illegible]	1[illegible]	1[illegible]	[illegible]
81	a) Hefe, frisch, 21,6proz.	[illegible] g	114	1,43	[illegible]	[illegible]
			178	[illegible] 21	[illegible]	
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	44,[illegible]	17,74	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	16,88	[illegible]	
	c) Heferückstand: Die abfiltrierte Hefe von der Extraktion von 25 g Preßhefe wog [illegible] g, davon [illegible] g zur Bestimmung, also [illegible] g ursprüngliche Preßhefe	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	142	[illegible]
			121	[illegible]	144	
	d) Mit [illegible] ccm H_2O ausgezogen	2,5 ccm	[illegible]	16,7[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	14,[illegible]	[illegible]	
82	Hefe, frisch, siehe [illegible]a					[illegible]
	a) wenig Wasser	5 ccm	[illegible]	11,17	[illegible]	[illegible]
	b) [illegible]faches Wasser	[illegible] ccm	[illegible]	1[illegible]	[illegible]	[illegible]
	c) Heferückstand von a): Die abfiltrierte Hefe von [illegible] g Preßhefe wog 27,8 g. Davon [illegible] g zur Bestimmung, [illegible] g ursprüngliche Preßhefe	[illegible] g	[illegible]	4,1[illegible]	[illegible]	[illegible]
	d) Mit [illegible] ccm H_2O ausgezogen	[illegible] ccm	[illegible]	1[illegible],7[illegible]	[illegible]	7[illegible]
	e) Heferückstand von b): Die rückständige Hefe von [illegible] g Preßhefe betrug 24,[illegible] g, also entsprechen die [illegible] g der Bestimmung [illegible] g ursprünglicher Preßhefe	0,446 g	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	f) Mit [illegible] ccm H_2O ausgezogen	[illegible] ccm	[illegible]	1[illegible]	114[illegible]	[illegible]
83	Hefe, frisch, siehe [illegible]a					515
	a) Essigester Toluol	2,5 ccm	[illegible]	[illegible]	41,[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	b) Toluol, siehe [illegible]b					[illegible]
84	Hefe, frisch, siehe [illegible]a					512
	a) Essigester Toluol	5 ccm	1[illegible],2	[illegible]	17,2	143
			21	[illegible]	1[illegible]	
	b) Toluol, siehe [illegible]b					153
85	Hefe, frisch, [illegible]proz.	[illegible] g	[illegible]	8,13	143	510
			74,5	6,57	15[illegible]	

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
85	a) Auszug mit $(NH_4)_2HPO_4$	5 ccm	19,7	+1,70	15,5	187
			33,2	3,80	16,5	
	b) Auszug mit Na_2HPO_4	5 ccm	12	2,25	15,4	195
			21,5	−0,75	22	
86	a) Hefe, frisch, siehe 77		—	—		410
	b) Essigester-Toluol	5 ccm	23,5	1,62	27,7	326
87	a) Hefe, frisch, siehe 1a					350
	b) 300 g Hefe mit 300 g H_2O und 7 g $CaCO_3$	2,5 ccm	40	7,38	89	528
			53	5,32	93	
88	Hefe, frisch, siehe 38					363
	a) Toluol:					
	1. 3 Tage, siehe 38b					280
	2. 5 Tage	5 ccm	43,5	2,9	28,3	290
			58	1,2	35,7	
	b) Chloroform: 1. 3 Tage	5 ccm	43	0,72	46,6	515
			59,5	0,38	48	
	2. 5 Tage	5 ccm	36	2,70	48,8	558
			55,5	0,70	50,3	
89	a) Hefe, frisch, siehe 40a					327
	b) Chloroform	2,5 ccm	31,8	12,92	185	1090
			49,3	10,58	177	
	c) Toluol, siehe 40b					380
90	a) Hefe, frisch, siehe 75a					317
	b) Chloroform und $CaCO_3$	5 ccm	27,5	6,91	54,7	650
			47	3,84	59,5	
	c) Toluol und $CaCO_3$	5 ccm	20	2,08	25	300
91	Hefe, nicht bestimmt					ca. 360
	a) ohne Phosphat	5 ccm	25	11,0	95	1200
			40	8,58	103	
	b) mit Phosphat	2,5 ccm	42,5	7,02	90	515
			64,5	3,53	94	
92	Hefe, nicht bestimmt					ca. 360
	a) ohne Phosphat	5 ccm	30	10,25	100	1200
			41	8,65	101	
	b) mit Phosphat	2,5 ccm	25,2	9,30	71,5	462
			50,5	3,56	77,5	
93	Hefe, frisch, siehe 6a					288
	a) Chloroform PO_4	2,5 ccm	66,5	1,73	80,7	293
	b) Toluol PO_4 siehe 52b					357
94	Hefe, frisch, siehe 53a					250
	a) Chloroform PO_4	2,5 ccm	30,5	0,98	44,3	200
	b) Toluol PO_4 siehe 53b					101
95	Hefe, frisch, siehe 3a					312
	a) Chloroform PO_4	2,5 ccm	20,2	1,7	15,6	189
	b) Toluol PO_4 siehe 54b					153
96A	a) Hefeauszug	5 ccm	17	1,24	30,8	
	b) Derselbe nach Kaolinbehandlung	5 ccm	46	0,91	40,6	
96B	Die beiden Bestimmungen sind aus praktischen Rücksichten auf den Wert 53 umgerechnet, was einer Verdünnung des Ausgangsextraktes von 40% entspricht					Menge-Zeit-Quotient
	a) Hefeauszug, siehe 33b					
	b) 25 ccm Auszug mit 24 ccm Wasser verdünnt und mit Kaolin behandelt	5 ccm	83	0,71	77,5	—
97	a) Hefeauszug	2,5 ccm	80,5	0,75	87,5	
	b) nach Kaolinbehandlung	2,5 ccm	85,5	0,50	80	
98	a) 1 l Hefeauszug	2,5 ccm	28,5	7,22	63,5	6,20
			46,5	3,0	65	
	b) derselbe mit 400 ccm Aceton verdünnt und mit Kaolin behandelt	2,5 ccm	73,5	3,07	103	5,45
	c) derselbe in einer 2. Probe	2,5 ccm	58,5	5,80	110	5,10
	d) derselbe in einer 3. Probe	2,5 ccm	48	7,30	107	5,23
99	a) 1 l Hefeauszug	2,5 ccm	33	3,75	46	8,70
	b) derselbe mit 400 ccm Aceton verdünnt und mit Kaolin behandelt	2,5 ccm	35,3	8,05	86	6,50
	c) derselbe mit einer 2. Probe	2,5 ccm	62,5	1,58	75	7,47
100	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	53	−1,60	41	0,499
	b) derselbe mit 40 ccm Aceton, 100 ccm Wasser und 15 g Kaolin	5 ccm	80	2,35	105	0,455
101	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	23,5	4,37	38	0,525

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
101	b) derselbe mit 40 ccm Aceton und 10 g Kaolin versetzt	1,25 ccm	60	11,56	242	0,462
102	a) 1 l Hefeauszug	2,5 ccm	54,5	3,81	82,5	4,85
	b) derselbe mit 400 ccm Aceton und 100 g Kaolin versetzt	2,5 ccm	60,5	9,45	183	3,06
103	a) 300 ccm Extrakt	2,5 ccm	91	6,60	184	0,65
	b) das nach der Behandlung mit dem Extrakt abfiltrierte Kaolin zu 200 ccm suspendiert	2,5 ccm	144	0,28	408	0,22
104	a) sofort	1,25 ccm	75	10,55	275	—
	b) nach 48 Stunden	1,25 ccm	140	6,50	278	
	c) nach 3 Tagen	1,25 ccm	123,5	7,00	262	
	d) nach 7 Tagen	2,5 ccm	145	0,18	149	
105	a) sofort	1,25 ccm	78,5	14,32	654	
	b) nach 3 Tagen	1,25 ccm	140,3	12,10	690	
	c) nach 7 Tagen	2,5 ccm	158	7,0	330	
			231,5	3,55	345	
106	a) sofort	1,25 ccm	77	10,80	285	
	b) nach 48 Stunden	1,25 ccm	143	7,02	301	
	c) nach 3 Tagen	1,25 ccm	123	5,22	310	
	d) nach 7 Tagen	2,5 ccm	152,5	1,40	177	
			226,5	−2,15	162	
107	a) sofort	1,25 ccm	82	12,78	476	
	b) nach 48 Stunden	1,25 ccm	147	9,20	415	
	c) nach 3 Tagen	1,25 ccm	122	9,90	384	
	d) nach 7 Tagen	2,5 ccm	149	4,38	236	
			223	0,90	246	
108	a) sofort	2,5 ccm	101	9,04	280	
	b) nach 48 Stunden	2,5 ccm	79,5	9,86	236	
	c) nach 72 Stunden	1,25 ccm	135	11,04	522	
	d) nach 7 Tagen	1,25 ccm	120	11,1	458	
	e) nach 7 Tagen und 4 Stunden	1,25 ccm	149	10,80	533	
			201,5	8,41	506	
	f) nach 8 Tagen	2,5 ccm	151	5,28	265	
			226	1,28	258	
109	a) sofort	5 ccm	69	3,48	100	
	b) nach 48 Stunden	5 ccm	47,5	6,09	91,5	
			81,7	1,20	93,5	
110	a) 1 l Hefeauszug	2,5 ccm	34,5	2,40	44,5	9,09
	b) derselbe mit 400 ccm Aceton	1,25 ccm	36	16,40	800	1,11
			266,5	12,60	1230	
111	Hefeauszug, siehe 110a		—	—	—	9,00
	a) 1400 ccm acetonhaltiger Hefeauszug sofort	1,25 ccm	61	12,45	107	3,73
			220,5	2,40	292	
	b) nach 24 Stunden	1,25 ccm	308,5	13,25	1870	0,6
112	a) 1 l Hefeauszug siehe 35b		—	—	—	6,17
	b) 1400 ccm acetonhaltig	2,5 ccm	84,5	14,30	710	0,79
113	a) 1 l Hefeauszug	2,5 ccm	34	2,18	43	9,10
	b) 1400 ccm acetonhaltig	2,5 ccm	86,5	2,1	62	9,10
114	a) 200 ccm acetonhaltiger Hefeauszug	5 ccm	30,5	5,38	55	0,715
	b) 250 ccm Adsorbat gewaschen	5 ccm	31	7,61	72	0,714
			50,5	2,84	68	
	c) dasselbe nach 24 Stunden	5 ccm	69,5	1,10	79,3	0,657
			92	−1,57	72	
	d) das Adsorbat aus 75 ccm acetonhaltigem Hefeauszug wurde nach 24 Stunden zu 100 ccm aufgeschlämmt:					
	75 ccm Acetonextrakt	—	—	—	—	0,265
	100 ccm Adsorbat	5 ccm	67	1,63	80,5	0,247
			89	−0,63	81,3	
115	1. ohne Aceton 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	38,5	4,51	62,5	0,321
	a) 200 ccm Adsorbat sofort	5 ccm	56	7,11	120,5	0,323
			84	3,28	119,5	

Nr	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2-dm-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge Zeit (Quotient)
115	b) 200 ccm Adsorbat nach 24 Stunden, im Extrakt gestanden	5 ccm	75	5,62	141	[illegible]
			38	3,54	147	
	c) Adsorbat a, gewaschen nach 24 Stunden	5 ccm	75,5	[illegible]	127,5	[illegible]
			91,5	3,1[illegible]	125,5	
	2 mit Aceton 100 ccm Extrakt					[illegible]
	a) 176 ccm Adsorbat sofort	5 ccm	55,5	6,31	1[illegible]	[illegible]
			79,5	[illegible]	1[illegible]	
	b) 176 ccm Adsorbat nach 24 Stunden, im Extrakt gestanden	5 ccm	67	6,75	138	[illegible]
			80,5	3,4[illegible]	1[illegible]	
	c) Adsorbat a, gewaschen nach 24 Stunden	5 ccm	73,5	6,5	121	0,227
			92,5	2,19	117	
116	a) 100 ccm Hefeauszug	2,5 ccm	33	6,58	[illegible]	0,466
			61	2,51	81,5	
	b) 150 ccm Adsorbat ohne Aceton	5 ccm	36,5	5,[illegible]	68	0,47[illegible]
			57,5	0,67	62,5	
	c) Mit Aceton, siehe 114b, auf 100 ccm Extrakt umgerechnet					[illegible]
117	a) 600 ccm Adsorbat	5 ccm	47	7,46	8[illegible]	1,45
			62	2,61	82,5	
	b) dasselbe nach 8 Tagen	5 ccm	65,5	4,47	1[illegible]	1,2[illegible]
			84,5	[illegible]	[illegible]	
	c) dasselbe nach 15 Tagen	5 ccm	87	1[illegible]	1[illegible]	[illegible]
			118	1,7[illegible]	141	
118	a) 200 ccm Adsorbat	5 ccm	75	6,68	70,2	1,1
			99	1,82	68,5	
	b) dasselbe nach 4 Stunden	5 ccm	47	6,92	96	0,78
			70,5	2,21	93	
	c) dasselbe nach 2 Tagen	5 ccm	36	[illegible]	111	[illegible]
			6[illegible]	8,08	105	
119	a) 843 ccm Hefeauszug siehe 116a					[illegible]
	b) 400 ccm Adsorbat	2,5 ccm	19,5	8,74	87	[illegible]
			33	4,[illegible]	87	
	c) dasselbe nach 24 Stunden	2,5 ccm	33,7	6,52	72,5	[illegible]
			64	1,16	6[illegible]	
120	a) 600 ccm Adsorbat, siehe 117a					1,45
	b) dasselbe, nach Eluieren zu 450 ccm aufgeschlämmt	5 ccm	45	12,5[illegible]	237	[illegible]
			78	11,2[illegible]	2[illegible]	
	c) dasselbe nach 5 Tagen	5 ccm	80	10,17	2[illegible]4	[illegible]
			111	7,[illegible]	2[illegible]	
121	a) 1 l Hefeauszug	1,25 ccm	74	8,6[illegible]	1[illegible]	4,22
	b) Adsorption aus 100 ccm siehe 124					
	c) 450 ccm acetonhaltiger Hefeauszug nach Zufügen von 10% Tonerde	1,25 ccm	62,5	13,57	460	2,4[illegible]
			227	[illegible],57	4[illegible]	
122	1400 ccm acetonhaltiger Auszug nach Zufügen von 20% Tonerde (äquivalente Menge auf 1 l Hefeauszug bezogen)	1,25 ccm	55,5	14,69	530	1,75
			136,5	11,[illegible]	[illegible]	
123	Alle Lösungen gleiches Volumen, Hefeauszug ohne Zusatz, siehe 108					
	100 ccm Hefeauszug	2,5 ccm			280 bis 226	0,14
	a) mit 4,5% Tonerde	2,5 ccm	95	9,60	282	0,14
	b) mit 9% "	2,5 ccm	94	10,56	340	0,118
	c) mit 18% "	2,5 ccm	92,6	12,00	440	0,091
	d) mit 32% "	2,5 ccm	92	15,15	545	0,042
124	Ebenfalls durch Zufügen von Wasser auf gleiches Volumen in jeder Probe gebracht und auf 100 ccm Hefeauszug verdünnt mit Wasser und Aceton berechnet					
	a) 100 ccm Hefeauszug	2,5 ccm	[illegible]	[illegible]	210	0,208
			36	6,5[illegible]	198	
	b) mit 16% Tonerde	2,5 ccm	45,5	11,4	[illegible]	[illegible]
	c) mit 8%	2,5 ccm	36	14,84	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	6[illegible]	
	d) mit 6%	2,5 ccm	27,5	1[illegible]	1[illegible]	[illegible]
			124	12,6[illegible]	1[illegible]	
	e) mit 8%	2,5 ccm	54	10,88	[illegible]	[illegible]
			126	10,8[illegible]	48[illegible]	
125	100 ccm Adsorbat	5 ccm	82	5,36	84	[illegible]
			13	1,48	81	
	a) 100 ccm NH_3 Elution	5 ccm	41,5	1[illegible]	1[illegible]	[illegible]
	b) 100 ccm Na_2HPO_4 Elution	5 ccm	[illegible]	[illegible]	66,7	[illegible]
			81	[illegible],81	66,7	
	c) 100 ccm $(NH_4)_2HPO_4$ Elution	5 ccm	38	6,22	68	[illegible]
			58,5	1,[illegible]	67	
	100 ccm Adsorbat	5 ccm	[illegible]	6,61	60	[illegible]
			42,5	1,63	[illegible]	
	57 ccm Oxalatelution	5 ccm	[illegible]	8,82	95	0,218
			57	4,0[illegible]	95	
	Ein normales, nicht bestimmtes Adsorbat wurde in gleichen Teilen mit Ammoniak und Soda eluiert und die Filtrate bestimmt. Die Nulldrehungswerte sind also direkt vergleichbar					
	a) NH_3 Elution	1,25 ccm	87,5	[illegible]	8[illegible]	
	b) Soda Elution	1,25 ccm	84,5	[illegible]	[illegible]	
126	100 ccm Adsorbat	5 ccm	61	5,48	6[illegible]	[illegible]4
			67	[illegible]	[illegible]	
	a) 92 ccm NH_3 Elution	5 ccm	47	[illegible]	141	[illegible]
			74,5	6,18	144	
	b) 92 ccm 0,5proz $NH_4CO_2CH_3$ Elution	5 ccm	4[illegible]	10,60	164	0,116
			7[illegible]	7,16	161	
	c) 125 ccm 0,5proz $NH_4CO_2CH_3$ Elution	5 ccm	44,5	11,47	28[illegible]	[illegible]
	d) 0,2proz $NH_4CO_2CH_3$ nach 1 Stunde noch keine merkliche Reaktion					
	e) 92 ccm 0,5proz Asparagin Elution	5 ccm	4[illegible]	10,[illegible]	160	0,118
			7[illegible]	7,01	146	
	f) 93 ccm 0,5proz Asparagin Elution	5 ccm	7[illegible]	8,17	173	0,111
			94	[illegible]	174	
	g) 126 ccm 0,5proz Asparagin Elution	5 ccm	77	14,36	[illegible]	[illegible]
			97	13,[illegible]	[illegible]	
127	100 ccm Adsorbat	5 ccm	74	6,26	66,2	[illegible]
	a) 92 ccm NH_3 Elution	5 ccm	67	6,1[illegible]	127	0,1[illegible]
			79	[illegible]	116	
	b) 92 ccm 0,5proz $CaCl_2$	5 ccm	61	7,14	1[illegible]	0,1[illegible]
			71	5,61	144	
	c) 92 ccm 0,5proz $CaCl_2$	5 ccm	6[illegible]	16,[illegible]	16[illegible]	0,014
			8[illegible]	16,[illegible]	14[illegible]	
	d) 1% $CaCl_2$ nach viertelstünd. Einwirkung noch keine Reduktion von Fehlingscher Lösung					
128	80 ccm Adsorbat	5 ccm	65,5	[illegible]	111,5	0,145
			103	[illegible]	10[illegible]	
	1 72 ccm NH_3 Elution	5 ccm	[illegible]	11,2[illegible]	[illegible]	[illegible]
			78	9,66	21[illegible]	
	2 Ohne NH_3 nach viertelstünd. Einwirkung auf Rohrzucker noch kein reduzierender Zucker nachweisbar					
	3 72 ccm 0,5proz NaH_2PO_4	5 ccm	31	10,86	190	0,087
			66,5	9,08	184	
	4 73 ccm 0,5proz Na_2HPO_4	5 ccm	55,5	10,27	18[illegible]	0,078
			68	9,10	189	

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 dm-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge Zeit-Quotient
128	5. 51,1 ccm 0,05proz. NH_3 und 0,05proz. NaH_2PO_4	5 ccm	44	6,77	91,8	0,115
			76	1,08	86,6	
	6. 51,5 ccm 2proz. Phosphat	5 ccm	62,5	3,88	93,7	0,114
			75	1,56	89	
	7. 63 ccm 1proz. NH_3 und 0,5proz. Phosphat	5 ccm	78	9,61	231	0,056
			103	6,88	213	
129	a) 200 ccm mit Bleiacetat beh. Hefeauszug	2,5 ccm	60	8,15	146	0,547
	b) 105 ccm NH_3 Elution	2,5 ccm	75,5	17,2	ca. 5000	ca. 0,005
	c) 200 ccm eluiertes Adsorbat	2,5 ccm	77	9,55	240	0,333
	d) 105 ccm Phosphatelution	2,5 ccm	70,5	3,80	120	0,30
130	a) 100 ccm Bleiacetat gereinigter Hefeauszug	5 ccm	47,5	3,07	70,3	0,288
			78,5	1,65	68,7	
	b) 100 ccm NH_3 Elution	5 ccm	58	15,55	750	ca. 0,009
			109	14,78	1090	
	c) 100 ccm Phosphatelution	5 ccm	64	8,02	174	0,125
131	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	32,5	3,16	44,7	0,445
			43	0,45	45,4	
	b) 100 ccm NH_3 Elution	5 ccm	59,5	4,04	92,5	0,218
132	220 ccm Adsorbat	5 ccm	57	2,07	78,5	0,56
			72	0,81	78,6	
	a) 142 ccm 1. Elution	5 ccm	78	14,75	647	0,045
			95	13,50	635	
	b) 255 ccm 2. Elution	5 ccm	102	15,55	1495	0,034
			135,5	15,15	1505	
133	a) 143 ccm Adsorbat	5 ccm	30,5	7,53	69,5	0,407
			37	5,05	70,5	
	b) 130 ccm 1. Elution	5 ccm	33	16,38	845	0,029
			60	15,87	910	
	c) 138 ccm 2. Elution	5 ccm	43	13,03	251	0,140
			62	11,08	244	
134	a) 325 ccm Adsorbat	5 ccm	77,5	3,17	108	0,60
	b) 340 ccm 1. NH_3 Elution	5 ccm	78	17,03	3025	0,015
			681	13,05	4120	
	c) 400 ccm 2. NH_3-Elution	5 ccm	77,5	17,20	3800	ca. 0,006
			679	15,80	9900	
	d) 332 ccm Phosphatelution	5 ccm	62,5	10,77	234	0,288
			87,5	8,55	255	
135	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	44	2,75	29,7	0,673
	b) 50 ccm NH_3-Elution	5 ccm	36	16,34	740	0,013
			40,5	15,77	730	
	c) 100 ccm Elution, Hefeauszug mit wenig Bleiacetat	5 ccm	19,5	0,00	53,7	0,39
			50	1,16	57	
	d) 100 ccm Elution, Hefeauszug mit überschüssigem Bleiacetat	5 ccm	19,5	11,34	80	0,248
			49,5	5,00	84	
136	a) 3600 ccm Hefeauszug	5 ccm	31,5	3,21	44,7	16,0
			44	0,25	45,2	
	b) 75 ccm eingeengte Elution	0,5 ccm	26,5	6,47	52,8	2,85
			50	0,60	53,8	
137	a) 100 ccm Hefeauszug mit Bleiacetat gereinigt	5 ccm	25,5	3,23	30,2	0,50
			40,5	0,80	44,3	
	b) 100 ccm NH_3-Elution	5 ccm	36	11,55	150	0,138
	c) 100 ccm Phosphatelution	5 ccm	32	8,37	80,5	0,25
			54	3,38	87	
138	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	60	0,51	56	0,358
	b) 100 ccm Waschwasser	5 ccm	71	14,03	534	0,084
			80	12,00	497	
	c) 100 ccm rückständiges Adsorbat	5 ccm	42,5	9,51	126	0,154
			60,5	7,13	131,5	
139	a) 500 ccm Invertinlösung	2,5 ccm	27	7,04	58	3,38
			40	3,75	60,5	
	b) 520 ccm Elution	2,5 ccm	26	7,00	58,5	3,38
			42	3,41	60,5	

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 dm-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge Zeit-Quotient
140	a) 400 ccm Invertinlösung	5 ccm	33	1,15	28,4	2,56
			40	2,5	27,5	
	b) 126 ccm Elution	1,25 ccm	34	3,67	50	1,95
			53,5	0,31	51,8	
141	a) 900 ccm 1. Elution aus Tonerde	1,25 ccm	41,5	6,15	80	3,0
			58,5	3,07	81	
	220 ccm 2. Elution	5 ccm	60	3,07	44	1,15
	b) 500 ccm Elution aus Calciumphosphat	1,25 ccm	52	10,63	110	3,2
			75,5	3,81	115	
142	a) 130 ccm Tonerdeelution	1,25 ccm	52,5	8,82	140	0,7
			75	5,67	135	
	b) 260 ccm Invertinlösung nach Zufügen d. Kaolins	2,5 ccm	52	16,00	855	0,11
			74,3	15,15	830	
143	a) 0,92 g Invertinpräparat	0,00138 g	14	9,00	39	6,58
			31	2,82	40,8	
	b) 295 ccm Elution	1,25 ccm	27	7,00	57	4,13
144	a) 1000 ccm Invertinlösung	0,625 ccm	22,5	9,30	64	25,0
	b) 375 ccm 1. Elution	1,25 ccm	33,5	2,71	22,3	13,2
	150 ccm 2. Elution	1,25 ccm	43,5	3,3	27	4,5
145	a) 250 ccm Präparatlösung	0,25 ccm	40	5,70	73,5	13,6
	b) 1100 ccm Elution	0,5 ccm	94	8,00	237	9,3
146	a) 2000 ccm Präparatlösung	1,25 ccm	51	0,2	50	32,0
	b) 300 ccm eingeengte Elution	0,25 ccm	29,5	8,82	79	15,3
147	a) 17,6 g Präparat	0,0025 g	32,5	9,30	92	75
			47	6,68	96	
	b) 1070 ccm Elution	1,25 ccm	76,5	2,70	53	29,8
148	a) 485 ccm Präparatlösung	1,25 ccm	34	4,47	55,2	7,0
			47	1,50	55,5	
	b) 2550 ccm Elution	2,5 ccm	49	12,70	262	4,1
			105	8,00	250	
149	a) 520 ccm Phosphatelution siehe 139b					3,38
	b) 790 ccm Dialysat	5 ccm	45	2,10	57,2	2,77
			55,5	0,28	57,0	
150	a) 500 ccm Phosphatelution, siehe 141b			—		3,61
	b) 590 ccm Dialysat	1,25 ccm	81	4,62	133	2,42
			122	0,53	129,5	
151	a) 285 ccm Elution	0,5 ccm	36	6,20	70	8,15
	b) 430 ccm Dialysat	1,25 ccm	24	5,15	42,5	8,07
152	a) 300 ccm Elution	0,25 ccm	40	6,77	82,5	14,5
	b) 483 ccm Dialysat	0,25 ccm	54	10,00	171	11,0
153	a) 100 ccm Präparatlösung	0,25 ccm	51	4,30	76,5	5,25
	b) 240 ccm Dialysat	0,25 ccm	76,5	8,34	192	5,15
			96,5	5,80	180	
154	a) 105 ccm Elution	0,025 ccm	168	7,00	356	11,7
	b) 205 ccm Dialysat	0,25 ccm	43	5,05	74,6	11,1
			56,5	2,40	74,0	
155	a) 390 ccm Elution	1,25 ccm	43	8,72	114	2,7
			55,5	6,80	116	
	b) 645 ccm Dialysat	2,5 ccm	66	3,10	92,7	2,8
			77	1,50	91,0	
156	a) 310 ccm Elution	0,25 ccm	70	12,85	424	3,1
			81	12,10	400	
	b) 380 ccm Dialysat	1,25 ccm	39	9,30	113	2,68
			51	7,35	113	
157	a) 2,50 g Präparat	0,00635 g	21	2,27	26,5	15,2
			39	-2,02	24,8	
	b) 500 ccm Mutterlauge	1,25 ccm	38	-0,88	34,2	11,7
158	a) 1,00 g Präparat, siehe 157a			—		6,06
	b) 185 ccm Mutterlauge	1,25 ccm	27,5	0,20	29,2	5,08
159	a) 50 ccm Kaolinelution, siehe 154a	—	—	—	—	5,63
	b) 155 ccm Uranelution	0,25 ccm	58	10,30	201	3,1
			85	7,65	198	
	Davon 142 ccm zur Dialyse angesetzt	—	—	—	—	2,84
	c) 226 ccm Dialysat	1,25 ccm	43,5	5,90	81,7	2,2
			57	3,30	82,3	
	d) 226 ccm filtriert	1,25 ccm	35,5	9,90	113	1,6
	e) nach 3 Wochen Stehen, 210 ccm 0,109 g Trockensubstanz enthaltend	1,25 ccm	60,5	8,30	152	1,11

Nr	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 dm Rohr	Nulldrehungszeit	Menge Zeit [illegible]
160	a) 50 ccm Kaolinelution, siehe 154a					[illegible]
	b) 165 ccm Mutterlauge	1,25 ccm	47	13,11	[illegible]	[illegible]
	c) [illegible] ccm Dialysat	1,25 ccm	43	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			65	[illegible]	66	
	d) nach 2 Wochen Stehen, Trockengehalt [illegible] g	1,25 ccm	50,5	[illegible]	[illegible]	[illegible]
161	a) Hefeauszug	2,5 ccm	28,5	7,22	[illegible]	
			45,5	[illegible]	68	
	b) 12,5 l Hefeauszug mit 40% Aceton verdünnt und mit Kaolin behandelt	2,5 ccm	73,8	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	c) 14,5 l Mutterlauge	2,5 ccm	67,5	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	d) 1850 ccm Tonerdeelution	0,25 ccm	47	[illegible]	[illegible]	24,8
	e) 37 ccm eingeengte Elution	0,025 ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	f) [illegible] g Präparat	[illegible] g	17,5	[illegible]	22,4	[illegible]
			27,5	2,1	20,8	
162	a) 12,5 l Kaolin gereinigter Hefeauszug	2,5 ccm	55,5	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	b) 265 ccm Elution	1,25 ccm	55	4,5	[illegible]	22,5
	c) 2,22 g Präparat	[illegible] g	[illegible]	1,4	47	[illegible]
			47,5	[illegible]	44	
163	a) 12,5 l Kaolin gereinigter Hefeauszug	2,5 ccm	57	[illegible]	[illegible]	14
	b) [illegible] ccm Elution	1,25 ccm	45	[illegible]	78	[illegible]
	c) 1,4 g Präparat	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			43	1,4	[illegible]	
164	Hefe und Hefeauszug siehe 24					
	a) 24 Lactonhaltiger Auszug aus dem Wert des Hefeauszugs berechnet					[illegible]
	b) 4 l Elution	2,5 ccm	[illegible]	[illegible]	44,5	[illegible]
	c) [illegible] ccm eingeengte Elution	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	d) [illegible] g Präparat	[illegible] g	21	[illegible]	[illegible]	[illegible]
165	a) 25 l Hefeauszug (ohne Aceton)	5 ccm	21,5	4,07	[illegible]	13,2
	b) [illegible] g Präparat	[illegible] g	31,5	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			41	[illegible]	[illegible]	
166	Präparat	0,012 g	[illegible]	5,1	[illegible]	
			28	4,4	[illegible]	
167	Präparat	[illegible] g	[illegible]	2,1	[illegible]	
168	a) 75 ccm eingeengte Elution	[illegible] ccm	22	[illegible]	22	13,6
	b) [illegible] g Präparat	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	20,1	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
169	a) 5 l Hefeauszug	2,5 ccm	55	5,70	[illegible]	[illegible]
			65	[illegible]	[illegible]	
	b) 1,24 g Präparat	[illegible] g	13,5	[illegible]	66,2	11,4
			24	[illegible]	71	
			45,5	1,7	[illegible]	
170	a) 7 l Hefeauszug	2,5 ccm	125	[illegible]	125	[illegible]
	b) [illegible] g Präparat	[illegible] g	34	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			51	[illegible]	[illegible]	
171	a) [illegible] g Präparat	[illegible] g	32,5	[illegible]	48	[illegible]
	b) 250 ccm filtrierte Präparatlösung, siehe 145a					[illegible]
	c) [illegible] ccm Elution, siehe 145b					0,25
	d) 490 ccm dialysierte Elution	1,25 ccm	24	[illegible]	[illegible]	0,25
	e) 0,183 g Präparat	0,0025 g	24,5	[illegible]	[illegible]	[illegible]
172	a) 0,92 g Präparat siehe 143a					6,45
	b) 275 ccm Elution siehe 143b					[illegible]
	c) 0,181 g Präparat	0,0025 g	14	1,52	17,0	4,22
			20	[illegible]	[illegible]	
173	a) 17,52 g Präparat siehe 147a					[illegible]
	b) 1970 ccm Elution siehe 147b					[illegible]
	c) [illegible] ccm eingeengte und gestandene Elution	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	d) [illegible] ccm dialysierte und gestandene Elution vor d. Eindampfen (Trockengehalt [illegible] g)	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
174	a) [illegible] g Präparat vom Wert [illegible] siehe [illegible] und [illegible] g Präparat vom Wert [illegible] siehe [illegible] waren vermischt worden					[illegible]
	b) Präparatlösung, siehe [illegible]					[illegible]
	c) Elution, siehe [illegible]					[illegible]
	d) Dialyse, siehe [illegible]					[illegible]
	e) weitere Dialyse, s. [illegible]					[illegible]
	f) [illegible] g Präparat	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			45,5	[illegible]	[illegible]	
175	a) 1. Bestimmung	[illegible] g	18	[illegible]	[illegible]	
			34	[illegible]	[illegible]	
	b) nach Aufbewahren über P_2O_5	[illegible] g	[illegible]	5,1	[illegible]	
			51	[illegible]	44,5	
	c) nach Stehen an der Luft (auf trockenes Präparat berechnet)	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	d) nach Stehen über P_2O_5	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	e) nach Stehen an der Luft (auf trockenes Präparat berechnet)	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
176	a) 1. Bestimmung	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	b) nach Stehen über P_2O_5	[illegible] g	11	[illegible]	[illegible]	
	c) nach Stehen an der Luft (Präparat feucht abgewogen)	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	71	
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
177	a) Präparat, siehe [illegible]					
	b) [illegible] g zu 100 ccm Wasser gelöst und nach 3 Tagen bestimmt	5 ccm	48	[illegible]	[illegible]	
	c) nach 2 Wochen wieder bestimmt	2,5 ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	d) nach 1½ Jahren	5 ccm	47,5	17,20	[illegible]	
			[illegible]	[illegible]		
178	1 a) [illegible] g Präparat	[illegible] g	28	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	b) [illegible] ccm Lösung nach 14 Tagen	1,25 ccm	44	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	2 a) 1,471 g Präparat, siehe [illegible]					[illegible]
	b) 295 ccm Lösung nach 14 Tagen	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	11,10	[illegible]	
	c) nach weiteren 14 Tagen	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	3 a) [illegible] g Präparat	[illegible] g	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	[illegible]	64	
	b) 100 ccm Lösung nach 14 Tagen	[illegible] ccm	44	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	c) dieselbe nach weiteren 14 Tagen	[illegible] ccm	41,5	[illegible]	[illegible]	[illegible]
179	a) Lösung des Präparates sofort	[illegible] ccm	51,5	[illegible]	[illegible]	
			[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	b) nach 3 Tagen, in Jenaer Glas gestanden	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
			[illegible]	[illegible]	92	
	c) im Silbergefäß 2 Tage gestanden	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	93	
			65	[illegible]	94	
	d) in gewöhnlichem Glas 3 Tage gestanden	[illegible] ccm	[illegible]	[illegible]	88	

Annalen der Chemie 427, S. 111 [1922].

46. ZUR KENNTNIS DES INVERTINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und FRITZ RACKE.

(Zweite Abhandlung.)

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Eingelaufen am 9. April 1921.)

Theoretische Einleitung.

Unsere erste Untersuchung hat zu dem Ergebnis geführt, daß die Isolierung des Invertins aus der Hefe nicht in einem einfachen Lösungsvorgang besteht. Nur ein Bruchteil des Enzyms geht beim üblichen Zerreiben und Abpressen oder Ausziehen mit Wasser in Lösung. Durch Trocknen der Hefe in der Wärme oder durch Behandlung mit Alkohol vermindert sich, ohne daß das Invertin selbst leidet, der in wäßrige Lösung übergehende Anteil. Bei dem besten Verfahren, um Invertin aus der Hefe zu isolieren, nämlich der raschen Autolyse, hängt die Ausbeute an Invertin in den Auszügen von der Art der Abtötung des Pilzes ab, auch wenn dabei kein Invertin zerstört wird.

Diese Beobachtungen führten zu der Frage, durch welche Vorgänge die Auflösung des Invertins herbeigeführt oder gestört wird, und durch welche Umstände die Unlösbarkeit des Invertins aus der Hefezelle bedingt wird.

Die Auflösung des Invertins wurde auf einen enzymatischen Vorgang zurückgeführt, den wir als Freilegung bezeichneten. Es war aber noch nicht möglich, zu entscheiden, ob die enzymatische Freilegung unbedingt erforderlich ist und ob sie das Invertin selbst oder seine Begleitstoffe angreift und verändert. Hier knüpft die vorliegende Arbeit an, die von folgenden Sätzen[1] der ersten ausgeht: „Es zeigt sich, daß im allgemeinen [112] enzymatischen Protoplasmaabbau ein bestimmter, einzeln zu beeinflussender Vorgang enthalten ist, der die Freilegung des Invertins bewirkt. Somit ist der langsame Übergang des Invertins in Lösung auf seine Lostrennung aus einer besonderen Verankerung entweder durch chemische Bindung oder durch Adsorptionsaffinität oder durch geschützte Lagerung zurückgeführt."

[1] Abschnitt A, IV, 1.

Eingehendere Versuche über die Abhängigkeit der Invertinauflösung von den Bedingungen der Hefeabtötung beweisen vollends, daß die Freilegung des Invertins enzymatisch verläuft und daß sie auf einem genauer zu bestimmenden Teilvorgang im allgemeinen Abbau der Hefesubstanz beruht. Die Hefe wird z. B. durch 50° warmes Wasser, durch 2proz. Essigsäure, durch 50proz. Alkohol, durch Essigester abgetötet. In allen diesen Fällen bleibt ihre invertierende Wirkung quantitativ erhalten, beim Erwärmen mit Wasser leidet sie erst bei 55°. Aber in der so vorbehandelten Hefe ist die Auflösung des Invertins verhindert und zugleich die ganze Autolyse entweder abgeschwächt oder in manchen Fällen hintangehalten. Wenn man dieses Verhalten mit der Voraussetzung betrachtet, daß die Freilegung des Invertins ein von der gesamten Autolyse zu unterscheidender Einzelvorgang ist, so findet man zwar einen großen Unterschied zwischen Invertin und freilegendem Enzym hinsichtlich der Beständigkeit, aber keinen deutlichen Unterschied zwischen diesem und den proteolytischen Enzymen der Hefe.

Bei manchen anscheinend verschiedenen Arten der Abtötung des Pilzes handelt es sich wahrscheinlich nicht um spezifische Wirkungen der angewandten Zellgifte, sondern eher um eine Wirkung der bei der Abtötung freiwerdenden Säure, die, je energischer diese vorgenommen wird, desto konzentrierter am Sitze des Invertins auftritt und zunächst die Abbauenzyme angreift. Es gibt aber auch eigentümliche Unterschiede zwischen den Wirkungen verschiedener Vorbehandlungen. Nach Abtötung der Hefe [113] mit Essigester bei gewöhnlicher Temperatur gelingt es, durch gründlichstes, mehrstündiges Zerreiben der Hefe — es bleibe zunächst unentschieden, ob mit enzymatischen Vorgängen, für die auch dann noch die Möglichkeit gegeben ist, oder ohne solche — alles Invertin wasserlöslich zu machen. Das ist nicht mehr der Fall, wenn die Behandlung mit Essigester bei etwa 40 bis 45° vorgenommen wurde. Das Invertin ist nunmehr in einer besonderen Weise festgelegt, wahrscheinlich durch einen Adsorptionsvorgang, so daß es nach vollkommenem Zerreiben durch Wasser nur zum geringen Teile gelöst wird. Hier läßt es sich aber ähnlich wie aus den Tonerdeadsorbaten durch Zusatz gewisser Elektrolyte, vor allem Dikaliumphosphat, freilegen und in Lösung überführen.

Es war nicht möglich, die Auflösung des Invertins zu unterbinden, es zunächst festzulegen und doch die Hefe durch Autolyse zu entleeren, weil Proteasen und Polysaccharasen unter denselben Bedingungen leiden wie das angenommene Invertin freilegende Enzym. Daher bleibt es auch noch zu entscheiden, ob die Freilegung des Invertins zu den eiweißabbauenden oder zu den kohlehydratlösenden Vorgängen gehört. Es gelang nun, die zerstörte Endotryptase durch Pepsin oder Trypsin zu ersetzen und in der am besten mit warmem Essigester abgetöteten Hefe die proteolytischen Vorgänge ohne Auflösung des Invertins vor sich gehen zu lassen. Der Eiweißinhalt der Hefe wird dadurch mit dem Erfolge abgebaut, daß über $^2/_3$ bis zu $^3/_4$ der Hefe-Trockensubstanz in Lösung übergeführt werden, während die Rückstände der Hefezellen die rohrzuckerinvertierende Wirkung unvermindert oder fast unvermindert besitzen.

Es sind die Kohlehydrate der Hefe, und zwar die unlöslichen, die das Invertin vor der Auflösung schützen und mit deren Abbau die Auflösung des Invertins Hand in Hand geht. Die proteolytisch entleerte Hefe liefert nämlich Invertinlösungen bei der Einwirkung von kohlehydratlösenden Enzymen, von Tannase und von [114] Malzdiastase. Die ganze Menge Invertin läßt sich bei diesen auch im präparativen Maßstab ausgeführten Versuchen den Heferesten entziehen, zugleich geht in sehr großer Menge Hefegummi[1] in Lösung, der in der Hefezelle nicht als solcher enthalten sein kann, sondern in Form unlöslicher Polyose vorkommt.

Die bei der Auflösung des Invertins durch enzymatischen Abbau des Hefekörpers beobachteten Erscheinungen sagen nichts darüber aus, ob das Invertin in der Hefezelle einem komplizierteren Kohlehydratmolekül angehört, oder ob es von der Polyose, sei es durch Adsorption, sei es durch Einlagerung in eine schützende Schicht, vor der Auflösung bewahrt wird. Aber die beiden ersten Möglichkeiten lassen sich durch genauere Untersuchung des Verhaltens beim Zerreiben der Hefe ausschließen. Wird die Hefe unter so starker Abkühlung, daß enzymatische Vorgänge nicht mehr in Betracht kommen, stundenlang mit Sand aufs feinste zerrieben, so wird das Invertin in seiner ganzen Menge wasserlöslich. Und da es, derart in Lösung übergeführt, gegen Adsorbentien dasselbe Verhalten zeigt wie in den gewöhnlichen Hefeauszügen, z. B. von Kaolin nicht adsorbiert wird, so liegt es auch nicht etwa in Form eines höhermolekularen Komplexes vor. Also ist in der Hefezelle lösliches Invertin vorhanden, es ist nicht oder nur locker an Bestandteile des Zellinhalts oder der Zellwand adsorbiert, so gut wie chemisch frei, aber durch eine mechanische Einrichtung, durch einen örtlichen Schutz, vor der Diffusion völlig geschützt. Während die Zuckermoleküle, Biosen, Triose, Tetraose, auch Lävulin, eintreten, während Triose (Mannotriose aus Stachyose) aus der Hefezelle auch austritt, [115] verläßt das Invertin weder die lebende, noch die abgetötete Hefezelle, solang ihre Membran nicht abgebaut ist. Es ist wahrscheinlich, daß das Invertin und die anderen kohlehydratabbauenden Enzyme, mit denen es sich ebenso wie mit Invertin hinsichtlich der Freilegung verhält, durch Einlagerung in die aus Polyosen gebildete Zellmembran geschützt sind.

Die zuckerhydrolysierenden Enzyme lassen sich daher auf zwei Weisen aus der Hefe isolieren und in Lösung überführen: aus der in der Form unversehrten Zelle durch enzymatische Freilegung, die im Polyoseabbau besteht, und rein mechanisch, nicht einfach durch Aufreißen oder Zerkleinern der Zelle, sondern durch die völlige Zerstörung der Zellstruktur. Diese erfolgt viel schwerer, als viele Forscher bei ihren Versuchen über Enzymdarstellung angenommen haben.

Die kohlehydratspaltenden Enzyme schienen sich bei ihrer Überführung in Lösung verschieden zu verhalten. Daher vertrat Emil Fischer[1]), um die Unterschiede in

[1] In der ersten Abhandlung (Abschnitt A, VIII) wurde gezeigt, daß Invertin und Hefegummi unter ähnlichen Bedingungen in Lösung gehen, daß es aber unter gewissen Verhältnissen, nämlich bei rascher Autolyse mit Chloroformwasser, gelingt, 30% des Invertins zugleich mit nur 3% vom Hefegummi des Pilzes in Lösung überzuführen.

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. **27**, 3479 [1894].

der Bildung von Invertin- und Maltaselösungen zu erklären, die Ansicht, „daß beim Auslaugen der frischen Hefe mit Wasser . . . nur das Enzym in Lösung geht, welches den Rohrzucker spaltet".

Es gilt indessen für alle diese Enzyme, daß sie nicht nur von der lebenden, sondern auch von der abgetöteten, aber noch unversehrten Hefezelle zurückgehalten werden. In allen Fällen bildet für sie die Zellmembran eine schützende Schicht. Sie muß entweder mechanisch, viel schwerer als angenommen wurde, oder durch enzymatischen Abbau zerstört werden. Da die Freilegung auf der Zerstörung von einer und derselben Schutzschicht beruht, so sind für die einzelnen zuckerspaltenden Enzyme nicht spezifische Freilegungsenzyme nötig. Dennoch erfolgt die Freilegung bei verschiedenen Beispielen nicht gleichmäßig leicht. Dies kann darauf beruhen, daß die [116] Zellhülle bei verschiedenen Rassen und Pilzarten mehr oder weniger dicht und dick sein kann und daß das freilegende Enzym reichlich oder spärlich vorhanden sein kann. Vielleicht ist Monilia candida, die ihr Invertin nach E. FISCHER und P. LINDNER[1] nicht an Wasser abzugeben vermag, arm an dem Enzym für die Polyosehydrolyse. Andere Unterschiede z. B. zwischen dem leicht von der Hefe abgegebenen Invertin und der Maltase, die man aus Frischhefe nicht in Lösung bringen konnte, erklären sich dadurch, daß unter den Bedingungen der Abtötung und Freilegung das eine Enzym unversehrt bleibt und das andere infolge der Bildung von Säure in der Hefezelle schon der Zerstörung anheimfällt.

Die Festlegung des Invertins durch Zerstörung des freilegenden Enzyms und die fraktionierte enzymatische Entleerung der Hefe, die proteolytische ohne Invertinabgabe und die diastatische unter Entbindung des Invertins, gewährte die Möglichkeit, Invertinlösungen von anderer Zusammensetzung wie bisher darzustellen. Die mit Essigester behandelte Hefe wird durch Einwirkung von Trypsin von ihrem Eiweißinhalt befreit und dann das Invertin zusammen mit Kohlehydraten durch Diastase in Lösung gebracht. Trotz des bedeutenden Gehaltes an Hefegummi besitzt die Lösung dreimal größeren Reinheitsgrad als in den durch Autolyse gewonnenen Hefeauszügen. Die Adsorptionsverfahren zur Steigerung des Invertin-Reinheitsgrades ließen sich auch auf dieses Ausgangsmaterial mit Erfolg anwenden. Wir erhielten so Invertinpräparate von ähnlicher Konzentration wie die in der ersten Arbeit beschriebenen. Sie waren gänzlich frei von Proteinsubstanzen und ihren Abbauprodukten, enthielten aber noch kleine Mengen von Kohlehydraten; umgekehrt war das Invertin aus den autolytischen Hefeauszügen frei von Kohlehydraten erhalten worden, aber gewöhnlich noch mit einem kleinen Gehalt an Proteinderivaten. Weder Fällungs- und [117] Farbreaktionen der Eiweißkörper noch die Reaktionen der Kohlehydrate kommen dem Invertin zu, und chemische Reaktionen, die über die Eigenart der Enzyme etwas aussagen, sind noch nicht gefunden worden.

Das Invertin, wie es vorliegt, ist nicht einheitlich; die beigemischten Stoffe sind von dreierlei Art:

[1] Ber. d. d. chem. Ges. **28**, 3034 [1895].

1. Fremdstoffe, darunter mineralische Bestandteile, die von den Adsorptionsmitteln herrühren. Die Glührückstände der Präparate von den Zeitwerten 0,7 bis 1 liegen zwischen 3 und 45%.

2. Verdorbenes Invertin. Wenn das Enzym größeren Reinheitsgrad erreicht hat, verdirbt es leicht, und es ist noch nicht bekannt, wie weit es durch Adsorptionsverfahren gelingt, wirksames und verdorbenes Enzym zu trennen.

3. Andere kohlehydrathydrolysierende Enzyme, wie Raffinase und Stachyase; es wird nämlich in einer Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und R. KUHN* gezeigt, daß z. B. die Raffinase nicht durch Invertin selbst gespalten wird, sondern durch ein spezifisches Enzym. Außer den Homologen des Invertins können auch die Produkte ihrer Zersetzung dem Präparate beigemischt bleiben.

In der Fortsetzung dieser Arbeit wird die Abtrennung des Invertins von den eigentlichen Fremdstoffen angestrebt. Aber die Trennung von den nahe verwandten zuckerspaltenden Enzymen liegt, so wie die Auflösung natürlicher Gemische von Eiweißstoffen, noch nicht im Bereich des Möglichen.

Experimenteller Teil.

A. Über mechanische und enzymatische Freilegung des Invertins.

1. Löslichkeit des Invertins aus zerriebener Hefe.

Das Ausziehen des Invertins aus frischer und aus getrockneter Hefe nach Zerreiben behandelte das Kapitel VIIa unserer ersten Arbeit. Während 1/2stündiges Zerreiben mit Seesand schon genügte, um die Struktur [118] der meisten Hefezellen anzugreifen, gelang es dadurch nicht, vom Invertin mehr als einen kleinen Teil lösbar zu machen (Tabelle 12). Wurde dann die zerriebene Hefe der raschen Autolyse unterworfen, so ging bei Gegenwart von Toluol das übrige Invertin in Lösung, indessen nicht bei Anwendung von Essigester (Kap. VIIb). Der unmittelbar lösliche Anteil des Invertins stieg bedeutend an, wenn man die Hefe längere Zeit gründlich mit größeren Sandmengen zerrieb.

Diese Zerreibungsversuche ermöglichten keinen klaren Einblick in den Zustand des Invertins, weil es sich dabei nicht um eine einfache Erscheinung handelt. Unter den Versuchsbedingungen waren enzymatische Vorgänge nicht ausgeschlossen, durch welche das Invertin löslich werden konnte, anstatt allein durch mechanische Zerstörung der Zelle. Andererseits genügte in den meisten Fällen das Zerreiben nur, um die Zelle aufzureißen oder zu zerstückeln, aber nicht, um sie weitgehend aufzuteilen und abzubauen.

Um Enzymwirkungen zu unterdrücken, unterwarfen wir nun die frische Hefe einer Vorbehandlung mit Essigester und zerrieben sie dann sehr gründlich (1 1/2 bis 2 Stunden) mit Sand. Das Invertin wurde dabei in guter Ausbeute löslich.

* *Vgl. Abh. 75, aber auch Abh. 81.*

Tabelle 1. Lösbares Invertin nach Behandeln mit Essigester und Zerreiben.

Nr.	Vorbehandlung mit Essigester	Zeitwert der Hefe	Zeitwert der Invertinlösung auf Hefe bezogen	Gelöstes Invertin in Prozenten
1	16 Stunden bei 20°	333	281	118
2	40 " " 20°	556	331	168
3	5 " " 40° nach Verflüssigung bei 20°	326	604	54

Daraus scheint hervorzugehen, daß ohne enzymatischen Vorgang, mit rein mechanischen Mitteln, Invertin [119] freigelegt und löslich gemacht wird. Aber auch diese Versuche sind nicht ganz beweisend. Es könnten mehrere invertinfreilegende Enzyme existieren: ein von Essigester leicht zerstörtes, lösliches, das bei der Autolyse unter Anwendung von Toluol die Bindung des Invertins löste, und ein gegen Essigester widerstandsfähigeres Enzym, und zwar ein unlösliches, das nur beim Verreiben die Freilegung des Invertins bewirkte, während es bei der Hefeautolyse nicht zur Wirkung auf das festgelegte Invertin käme.

Mit derselben Absicht verarbeiteten wir getrocknete Hefe, nicht wie früher unter Befeuchten, sondern eben im lufttrockenen Zustand, obwohl es sich in diesem viel schwerer zerreiben läßt. Dabei trat großer Invertinverlust ein, und zwar auch noch bei den späteren, unter starkem Abkühlen ausgeführten Versuchen. Von dem nach mehrstündigem Zerreiben der Trockenhefe noch vorhandenen Invertin waren große Anteile durch Wasser sofort extrahierbar. Beispielsweise besaß eine nach dem Krause-Verfahren getrocknete Bierhefe, die wir der Gefälligkeit des Herrn Prof. C. OPPENHEIMER verdankten, nach 4stündigem Verreiben mit dem 20fachen an Seesand noch 82% ihres Anfangsgehaltes von Invertin. Beim Ausziehen der zerriebenen Masse mit Wasser gingen 41% des ursprünglichen Invertins, beim Ausziehen mit 16proz. Rohrzuckerlösung 82% des noch vorhandenen, 64% des ursprünglichen Invertins in Lösung.

Eine andere Hefeprobe war vor dem Trocknen mit Essigester vorbehandelt. Nach $3^1/_2$stündigem Verreiben mit dem 20fachen an Seesand erwiesen sich 65% des vorhandenen Invertins beim Behandeln mit Rohrzucker, bei einer analogen Probe 56% davon mit Wasser löslich. Allerdings fehlten in diesem Falle vier Fünftel des Enzyms, die beim Zerreiben zerstört waren.

Die Mitwirkung enzymatischer Faktoren ist in diesen Versuchen nicht wahrscheinlich, aber auch nicht unmöglich. Es gelingt, sie ganz auszuschließen und das [120] Invertin der Hefe allein durch mechanische Einwirkung in Lösung zu bringen durch Anwendung tiefer Temperatur.

Mit flüssiger Luft werden 3 g Bierhefe (Trockengewicht 25%, Zeitwert 275) zusammen mit 15 g Seesand im Reagierrohr abgekühlt, während wir die Porzellanreibschale längere Zeit in feste Kohlensäure eindrückten und auch innen mit fester Kohlensäure beschickten. Wir verrieben während $3^1/_2$ Stunden die Hefe in sieben Portionen, indem von Zeit zu Zeit, etwa alle $1^1/_2$ bis 2 Minuten, etwas feste Kohlensäure, hin und wieder auch flüssige Luft in die Reibschale zugegeben wurde. Jeden

einzelnen Anteil zerrieben wir 10 bis 15 Minuten, dann wurde mit der einmal zerriebenen und wieder in flüssiger Luft aufbewahrten Masse das Zerreiben in kleinen Anteilen wiederholt. Nach 2 Stunden wies das mikroskopische Bild noch einen nicht unbeträchtlichen Bruchteil unversehrter Zellen auf, am Schlusse fast keine mehr; die Hefe war in kleine schwammige Fetzen verwandelt. Schließlich wurde das in der flüssigen Luft gesammelte Produkt unter Zusatz von Essigester aufgetaut, dann zur Invertinbestimmung mit Puffer und 125 ccm 32proz. Rohrzuckerlösung auf 250 ccm gebracht und 45 Minuten geschüttelt. Die Bestimmung ergab den Zeitwert 440, also waren fast 40% zerstört.

Fast das gesamte noch vorhandene Invertin erwies sich als löslich. Um darauf zu prüfen, wurde nach den 45 Minuten der ersten Bestimmung die Hälfte der Flüssigkeit an der Zentrifuge von der Hefe getrennt. Dann wirkte in der einen Hälfte nur das gelöste Invertin, in der anderen auch die Hefemasse auf den Rohrzucker weitere 45 Minuten ein. Die nichtfiltrierte Flüssigkeit ergab jetzt den Zeitwert 510, die abfiltrierte Lösung 554, entsprechend einem Gehalt von 92% des vorhandenen Invertins (Anh. Nr. 1).

Einen zweiten Versuch führten wir mit 5 g Hefe (Menge-Zeit-Quotient 0,083) und 20 g Seesand aus. Die ebenso wie oben zerriebene Hefe wurde aus der flüssigen [121] Luft entnommen und mit 100 ccm Wasser unter Zusatz von Essigester 1/2 Stunde angeschüttelt. Der durch Klärerde filtrierte wäßrige Auszug diente zur Bestimmung des Invertins. Ohne Verlust (auf dem Filter) filtriert gedacht, enthielt die Lösung 42% des ursprünglichen Invertins (M.Z.Q. 0,035). Die abfiltrierte Hefe ergab nach Abrechnung des in ihr enthaltenen Extraktes noch einen Invertingehalt von 12% des ursprünglichen (M.Z.Q. 0,01), so daß nach dem Zerreiben noch 54% vom Invertin vorhanden waren, davon 4/5 in löslichem Zustand (Anh. Nr. 2).

Die Invertinlösung war trotz Anwendung der spanischen Klärerde merklich trüb. So war es zweifelhaft, ob hier dasselbe klar lösliche Invertin wie bei dem enzymatischen Lösungsvorgang oder ein, sei es höhermolekulares, sei es mit hochmolekularen Begleitstoffen assoziiertes vorlag. Darum wurde der Hefeauszug mit Kaolin (55 ccm mit 10 g) geschüttelt und filtriert. Die Lösung wies nun fast denselben Zeitwert auf wie zuvor. Das durch mechanische Mittel in Lösung gebrachte Invertin zeigt also das nämliche Verhalten gegen das Adsorptionsmittel wie durch Autolyse gewonnenes. Die wasserklare Lösung gab die Xanthoproteinreaktion deutlich, sie lieferte zwar mit Fehlingscher Lösung keinen Niederschlag, wirkte aber nach 5 Minuten langem Kochen mit 20proz. Salzsäure reduzierend.

II. Über die Zerstörung des Invertin freilegenden Enzyms.

1. *Durch Erwärmen mit Wasser.*

Die Einwirkung höherer Temperatur auf die Lösbarkeit des Invertins wurde im Kapitel A IV, 5a der ersten Abhandlung behandelt. Durch Trocknen der Hefe bei 105° leidet, wie wir dort wahrscheinlich machten, das für die Freilegung nötige

Enzym in höherem Grade als das Invertin selbst, so daß danach bei 3tägigem Ausziehen nur $^1/_{10}$ des ursprünglichen, d. i. $^1/_4$ des noch [122] vorhandenen Invertins in Lösung ging. Der Unterschied zwischen der Beständigkeit von Invertin und freiliegendem Enzym kommt beim Erwärmen mit Wasser stärker zur Geltung, trotzdem die Zerstörungstemperaturen für beide einander sehr nahe liegen. Das Invertin wird nämlich beim Erwärmen mit Wasser von 55°, das freiliegende Enzym mit Wasser von 50° vernichtet. Zugleich mit dem freiliegenden Enzym und in gleichem Maße wie dieses leiden aber auch die proteolytischen Enzyme. Es gelingt daher nicht, die Hefe durch Behandeln mit warmem Wasser so für die Autolyse vorzubereiten, daß ein großer Teil des Zellinhalts austritt, während das Invertin zurückbleibt. Auch bei der Einwirkung von Säure, von Alkohol und von Essigester fällt die Schädigung der allgemeinen Autolysenenzyme und des Invertin freilegenden Enzyms zusammen.

Die Hefe teigten wir mit dem gleichen Gewicht Wasser an und erwärmten sie im Wasserbade. In 2½ Stunden bei 55° (± 1°) trat Verlust von 30% des Invertins ein, bei 49½° (± ½°) während [illegible] Stunden blieb der Zeitwert unverändert ([illegible]). In letzterer Hefe hatte das freiliegende Enzym schon stark gelitten; die Autolyse (1 Teil Hefe mit 2 Teilen Wasser unter Zusatz von Chloroform) lieferte in 3 Tagen nur 10% von gelöstem Invertin und auch nur 15% von gelöstem Trockengewicht der Hefe anstatt der normalen Menge von 60 bis 70%.

In einem anderen Versuche erfolgte die Vorbehandlung mit Wasser während 6 Stunden bei [illegible]; in 15 Minuten stieg die Temperatur auf 55°. Vom Invertin waren noch 84% vorhanden, das freiliegende Enzym war vernichtet. Es war nämlich bei dreitägiger Autolyse unter den üblichen Bedingungen nicht möglich, eine meßbare Menge Invertin in Lösung überzuführen. Es gingen aber auch nur 4% von der Trockensubstanz der Hefe in den Auszug.

2. Durch Einwirkung von Essigsäure.

Während 0,003n-Essigsäure nicht anders wie Wasser wirkt, genügt 0,3n-Essigsäure schon bei Zimmertemperatur, um völlige Zersetzung des freiliegenden Enzyms herbeizuführen, ohne aber das Invertin selbst anzugreifen.

Mit 0,003 n-Essigsäure behandelten wir Hefe je 1½ Stunden bei 45° und bei 50°. Im ersten Falle wurde die Autolyse nicht [123] beeinträchtigt; es trat bei Gegenwart von Toluol sogar deutliche Selbstgärung auf. In 3 Tagen gingen 24% Invertin, 33% Trockensubstanz in den Auszug. Im zweiten Falle brachte die Autolyse 12% vom Invertin, 20% vom Trockengewicht in Lösung.

Bei Zimmertemperatur wurde 0,03 n-Essigsäure noch gut ertragen. Die dreitägige Autolyse der so vorbehandelten Hefe legte 36% vom Invertin, 35% vom Trockengewicht frei.

0,3 n-Essigsäure ließen wir 40 Stunden auf frische Hefe einwirken. Der Invertinzeitwert betrug vorher 200, nach der Behandlung 312; auch enthielt der gebildete Saft 8% vom Invertin. Diese vorbehandelte Hefe lieferte unter den üblichen Bedingungen keine Invertinlösung, aber sie erlitt auch keine Autolyse mehr. Nach 3 Tagen enthielt der bei Gegenwart von Toluol gebildete Auszug 1½% vom Invertin, 3½% vom Trockengewicht.

3. Durch Einwirkung von 50 proz. Alkohol.

Nach W. A. OSBORNE[1] wird die Hefe vor dem Ausziehen des Invertins durch Chloroformwasser der Einwirkung von Alkohol unterworfen, um die Eiweißkörper zu koagulieren. Unsere Kritik des Verfahrens (I. Abh., A, IV 5b) zeigte, daß die so vorbehandelte Hefe das Invertin viel schwerer freigibt. Es war noch zu beweisen, daß dabei nicht das Invertin leidet, sondern nur die Freilegung gestört wird.

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 399 (1899).

Wir ließen 7 Stunden bei Zimmertemperatur etwa 50proz. Alkohol einwirken, indem wir Preßhefe mit dem gleichen Gewicht 95proz. Alkohols vermischten. Die Invertinbestimmung, so wie mit frischer Hefe ausgeführt, ergab danach wohl infolge der Koagulation einen zu niedrigen Wert, immerhin 80% des ursprünglichen Enzymgehaltes. Aber in 3tägiger Autolyse mit Toluol gingen nur 6% des Invertins in Lösung.

Bei 15° wirkte der 50proz. Alkohol auch auf Invertin zerstörend; in 1½ Stunden sank der Invertingehalt auf 3 bis 4%.

4. Durch Einwirkung von Essigester.

In der ersten Abhandlung (Kap. A, VIIb) wurde gezeigt, daß die Autolyse der Hefe bei Gegenwart von Essigester nur sehr invertinarme Lösungen liefert. Da bei der Abtötung der Hefe durch Essigester rasch [124] Säurebildung in der Zelle einsetzt, so entsteht in ihr eine für das freilegende Enzym gefährliche Säurekonzentration. Die Wirkung auf die Freilegung des Invertins ließ sich daher durch Neutralisieren der beim Abtöten auftretenden Säure verhüten.

Unsere weiteren Versuche über die Wirkung des Essigesters bestätigen die Vernichtung des freilegenden Enzyms. Ferner wird der Verlauf der allgemeinen Autolyse nach der Zerstörung desselben, also unter den Bedingungen der Invertinfestlegung, geprüft. Es wird untersucht, mit welchem Erfolg die Autolyse der Hefe, die Auflösung der Proteine und Kohlehydrate, nach der Vorbehandlung mit Essigester vonstatten geht. Um die autolysierenden Enzyme möglichst zu schonen, mußten die gelindesten Bedingungen gesucht werden, unter denen der Essigester das Invertin freilegende Enzym auszuschalten vermag.

Wird die abgepreßte Brauereihefe unverdünnt mit Essigester (10 bis 20% desselben) angeschüttelt, so beginnt nach einigen Sekunden das Erweichen, und es vollzieht sich in etwa 1 Minute die vollständige Verflüssigung der Hefe. In den früheren Versuchen hatten wir dabei die Hefe mit Wasser verdünnt; die Wirkung des Essigesters war dadurch gemildert, so daß immerhin eine nicht geringfügige Invertinmenge bei der Autolyse noch austreten konnte. Nach Verflüssigung der unverdünnten Preßhefe, wie wir nun vorzugsweise arbeiten, belief sich der Anteil des Invertins, der bei der Autolyse löslich wird, zumeist nur auf wenige Prozente, gewöhnlich weniger, als schon in den bei der Verflüssigung austretenden Saft übergeht.

Die Einwirkung des Essigesters auf die Hefe erforderte mehrere Stunden. Zunächst versuchten wir den Essigester bei Zimmertemperatur nur eine halbe Stunde einwirken zu lassen. Die Hefe wurde in der Zentrifuge vom Verflüssigungssaft getrennt, gewaschen und mit dem doppelten Gewicht Wasser und 10% Toluol [125] 3 Tage der Autolyse überlassen. Der Verflüssigungssaft enthielt 7, die Autolysenflüssigkeit noch 30% vom Invertin der Hefe.

Diesen Versuch wiederholten wir mit 7 Stunden dauernder Einwirkung des Essigesters. Die Autolyse unter denselben Versuchsbedingungen ergab jetzt nur 4% von gelöstem Invertin; dabei waren aber auch nur 18% von der Trockensubstanz der Hefe ausgetreten. Die Autolyse war also stark gehemmt. Der Hefeauszug war arm an Eiweißderivaten und sehr arm an Kohlehydraten, Hefegummi war nicht nachzu-

weisen, auch war die Reduktion von Fehlingscher Losung nach Kochen mit Mineralsaure sehr gering.

In der Warme leidet das freilegende Enzym viel rascher. Allein die Temperatur von 37° darf nicht uberschritten werden, da sonst auch das Invertin unter den Bedingungen der Hefeabtötung angegriffen wird. In vergleichenden Versuchen wurden je 50 g Hefe mit 10 ccm Essigester vermischt, nachdem man beide auf die Versuchstemperatur a) 45°, b) 30½°, c) 37° angewarmt hatte. Dann hielten wir die Temperatur noch einige Zeit konstant, bei a) ¾ Stunde, b) 1 Stunde, c) 3 Stunden. Wahrend bei 45° 90% vom Invertin wahrscheinlich durch die beim Abtoten auftretende Saure vernichtet war, betrug der Verlust bei 30½° nur 25% und bei 37° blieb der Invertingehalt unverandert.

Die bei 37° wahrend 1½ Stunden mit Essigester behandelte Hefe gab bei der Autolyse unter Toluolzusatz Auszuge, 3 bis 4% vom Invertin enthaltend, mit noch weniger Trockensubstanz als die in der Kalte vorbehandelte Hefe. Die autolysierenden Enzyme sind auch bei der abgekurzten Einwirkung des Essigesters nicht geschont geblieben. Der bei 37° gebildete Verflussigungssaft enthielt 6 bis 8% des Invertins und 22 bis 28% des Trockengewichts der Hefe, so daß im ganzen 33 bis 36% der Hefesubstanz loslich wurden.

Wenn durch die Behandlung mit Essigester unter [126] Schonung des Invertins die an seiner Freilegung und an der allgemeinen Autolyse beteiligten Enzyme angegriffen werden, so können zugleich feine Veranderungen im Zustand des Invertins auftreten, die sich bei grundlichem Zerreiben der Hefe und Ausziehen mit Wasser zeigen. Wie oben die Beispiele der Tab. 1 erkennen ließen, wird bei stundenlangem Zerreiben der mit Essigester behandelten Hefe mit Sand das Invertin in seiner ganzen Menge wasserlöslich. Nur ein Bruchteil der Invertinmenge wird aber unter gleichen Bedingungen wasserlöslich, wenn die Einwirkung des Essigesters in der Warme stattgefunden hat. Hier spielt eine sekundare Erscheinung, welche die Lösbarkeit des Invertins vermindert, eine Rolle. Diese besondere Festlegung des Invertins scheint auf einem Adsorptionsvorgang zu beruhen. Wenn namlich die mit Essigester in der Warme behandelte Hefe, die nach dem Zerreiben nur wenig Invertin abzugeben vermag, entweder zusammen mit dem bei der Hefeverflussigung ausgeschiedenen Saft zerrieben — dies ist in Beispiel 3 der Tab. 1 der Fall, indem dort der Verflussigungssaft gar nicht abgetrennt wird — oder aber nach dem Zerreiben unter Zusatz des Saftes extrahiert wird, so geht wieder viel mehr Invertin in Lösung. Dieser Einfluß des Verflüssigungssaftes ist keine enzymatische Wirkung; er kommt auch der gekochten Flüssigkeit und sogar der Asche zu, die uberwiegend aus Alkaliphosphaten besteht. Die Wirkung dieses Verflussigungssaftes laßt sich daher durch Anwendung von Dikaliumphosphat ersetzen. Die gründlich zerriebene, das Invertin nur zum kleinen Teil an Wasser abgebende Hefe laßt bei Zusatz von sekundarem Kaliumphosphat sofort einen großen Teil des Invertins in Lösung gehen. Der Zusatz des Elektrolyten bewirkt hier die Elution ahnlich wie bei den Adsorbaten von In-

vertin in Aluminiumhydroxyd oder Kaolin. Diese Erscheinung wird nicht beeinflußt, wenn nach der Behandlung mit Essigester die im folgenden beschriebene pankreatische [127] Hydrolyse und Beseitigung der Eiweißkörper stattgefunden hat. Auch dann ergibt der Zerreibungsversuch eine Fixierung des Invertins, die vom Verflüssigungssaft oder einfacher von Kaliumphosphat aufgehoben wird.

Nach 40 Stunden langem Behandeln mit Essigester bei 20° gab die Hefe (Beispiel 2 der Tab. 1) bei stundenlangem Zerreiben 100% vom ursprünglichen Invertin an Wasser ab; 8% davon waren im Verflüssigungssaft enthalten. Wir trennten diesen von einer Probe der mit Essigester behandelten Hefe ab und zerrieben sie in derselben Weise. Auch dann waren 84% des Invertins wasserlöslich.

Abweichend war das Verhalten der mit Essigester verflüssigten und dann 5 Stunden auf 46° erwärmten Hefe (Beispiel 3 der Tab. 1). Während beim Verreiben ohne Abtrennung des Verflüssigungssaftes 91% des Invertins löslich wurden, gingen nach Abtrennen desselben Saftes und ebenso gründlichem Verreiben beim Ausziehen mit reinem Wasser nur 34% des Invertins in Lösung.

In zwei anderen Beispielen erwärmten wir die Hefe nach der Verflüssigung durch Essigester auf 45° a) 1½, b) 3½ Stunden. Dann wurde die vom Verflüssigungssaft getrennte und ausgewaschene Hefe 1½ bis 2 Stunden mit der doppelten Menge Seesand zerrieben und mit Wasser ausgezogen. Die Lösungen enthielten nur a) 46, b) 23% des ursprünglichen Invertins.

In einigen dieser Versuche wurde zwischen die Abtötung durch Essigester und das Zerreiben die Behandlung der Hefe mit Trypsin eingeschaltet. Wir verflüssigten z. B. 1 kg Preßhefe in der Kälte mit Essigester und erwärmten damit 3 Stunden auf 40 bis 45°. Nach Abtrennung des Verflüssigungssaftes in der Zentrifuge setzten wir die Hefe mit Trypsin und Natriumacetat 5 Tage unter Rühren bei 30° an und trennten sie danach von dem gebildeten Auszug. Die Heferückstände enthielten noch 70% vom ursprünglichen Invertin. Davon gingen beim Zerreiben (1 Teil Hefe 2 Teile Seesand, 1½ Stunden) und Ausziehen mit Wasser während einer halben Stunde 20, 30, 27% in Lösung. In Parallelversuchen wurden die Heferückstände zusammen mit der entsprechenden Menge des Verflüssigungssaftes oder mit der Hälfte davon zerrieben und mit Wasser ausgezogen oder für sich allein zerrieben und mit Wasser unter Zusatz des Verflüssigungssaftes ausgezogen. Nunmehr betrug die Ausbeute an gelöstem Invertin 80, 100, 100, 100%. In einem weiteren Versuche wurde der Verflüssigungssaft 15 Minuten gekocht. Beim Verreiben zugefügt, bewirkte er, daß die Menge des in Lösung gehenden Invertins wieder 92% erreichte. Der Verflüssigungssaft wurde eingedampft und verascht, die mit etwas Wasser [128] aufgenommene Asche beim Zerreiben der Heferückstände zugesetzt. Darauf wurden 70% des Invertins löslich und ebenfalls 70%, als wir statt der Asche 0,5 g K_2HPO_4 mit 0,05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ zu 25 g Heferückständen (Trockengewicht 6 g), sei es beim Zerreiben oder nach demselben, beim Ausziehen mit Wasser zufügten.

III. Einwirkung proteolytischer Enzyme nach Zerstörung des Invertin freilegenden Enzyms.

Unter verschiedenen Bedingungen des Abtötens der Hefe geht zugleich mit dem Invertin freilegenden Enzym die Endotryptase der Hefe zugrunde. Es könnte also sein, daß die enzymatische Freilegung des Invertins ein proteolytischer Vorgang wäre. Um dies zu prüfen, ließen wir auf die z. B. mit Essigester abgetötete Hefe proteolytische Enzyme einwirken, Pepsin und Trypsin. Es gelang nicht, auf diese Weise das Invertin freilegende Enzym zu ersetzen und das Invertin zugleich mit der großen Menge von Proteinsubstanzen der Hefe in Lösung überzuführen. Nur unter gewissen Bedingungen wurde bei weitgehender Entfernung der Eiweißkörper durch Abbau ein Teil des Invertins langsam frei und löslich. Wie bei den Zerreibungsversuchen ein Unterschied zwischen den bei niedriger und höherer Temperatur mit

Essigester abgetöteten Hefen zutage getreten ist, der auf einen in der Wärme erfolgenden sekundären Vorgang besonderer Festlegung des Invertins hindeutete, so widersteht auch je nach den Umständen der Vorbehandlung mit Essigester das Invertin der Auflösung in verschiedenem Maße. Die kalt mit Essigester vorbehandelte Hefe gibt bei der Behandlung mit dem (übrigens diastasehaltigen) Pankreasenzym Invertin in Lösung, die warm vorbehandelte Hefe aber nicht.

Der Schutz, den das Invertin in der Hefezelle genießt, wird also nicht oder nur untergeordnet durch Proteine bewirkt. Nach diesem Ergebnis war es möglich, in anderer Richtung den enzymatischen Abbau der Eiweißkörper auszunützen, nämlich um die Hefe unter [129] Hinterlassung des Invertins von einem möglichst großen Teil ihrer Inhaltsstoffe, namentlich aus der Proteingruppe, zu befreien, so daß sie dann ein besonders günstiges Ausgangsmaterial für die Darstellung von Invertin bieten sollte. Nachdem von der Hefe schon 23 bis 28% der Trockensubstanz in den Verflüssigungssaft ausgetreten waren, sind bis zu weiteren 50% des ursprünglichen Trockengewichts bei der Proteolyse weggelöst worden, also im ganzen etwa ¾ der Trockensubstanz zusammen mit nur 10 bis 15% vom Invertin.

Für diese Versuche diente ein Pepsinpräparat von E. Merck, von dem 1 Teil nach der im Handel üblichen Bezeichnung „10000 Teile Eiweiß verdaut", und als Trypsin ein Pankreaspräparat, das wir der Freundlichkeit des Herrn Dr. Ch. Hollander in der Rohm & Haas Co., Bristol, Penna (U. S. A.), verdanken; es enthielt neben viel Trypsin u. a. auch etwas Diastase.

Die mit Essigester behandelte Hefe trennten wir vom Verflüssigungssafte ab und ließen darauf im Thermostaten von 30° bei Gegenwart von Toluol unter Rühren 3 bis 6 Tage lang proteolytisches Enzym einwirken, und zwar 1% Enzympräparat, bezogen auf die angewandte Preßhefe, Trypsin unter Zusatz von Natriumacetat, Pepsin ohne Zusatz. Durch die Entleerung werden die Hefezellen so leicht, daß sie sich in vielen Fällen nicht mehr mit der Zentrifuge sedimentieren lassen; sie wurden abfiltriert und gewaschen. In diesen Heferückständen gelingt es so wie in frischen oder mit Essigester abgetöteten Hefen ohne Zerkleinerung das Invertin quantitativ zu bestimmen.

Nach der Vorbehandlung mit Essigester bei gewöhnlicher Temperatur (Tab. 2) wird durch Einwirkung von Pepsin bis zu einem Drittel, von Pankreasenzym bis zu zwei Dritteln des Invertins in Lösung gebracht. Hingegen hält die mit Essigester erwärmte Hefe (Tab. 3) das Invertin in allen Fällen zum größten Teil zurück.

Die durch Trypsinwirkung entstandenen Auszüge [130] gaben weder mit Salpetersäure noch beim Kochen Ausflockung, mit Ferrocyanat keine Fällung, keine Biuretreaktion, aber sie zeigten sehr starke Millonsche Reaktion, Fällung mit Bleiacetat und Auflösung von Kupferhydroxyd. An Kohlehydraten waren sie sehr arm, mit Fehlingscher Lösung trat unmittelbar eine geringe Reduktion ein, Hefegummi war nicht nachzuweisen.

Tabelle 2. Auflösung von Invertin und Trockensubstanz aus *kalt* mit Essigester behandelter Hefe.

Nr.	Vorbehandlung	Proteolyse	Gelöste Trockensubstanz Proz.	Gelöstes Invertin Proz. bezogen auf die frische Hefe	Gelöstes Invertin Proz. bezogen auf das am Ende bestimmte
1	16 Stunden	5 Tage mit Trypsin	48	71	132
2a	40 „	3 „ „ „		41	50
		5 „ „ „		50	65
2b	40 „	5 „ „ Pepsin	45	10	12
3	16 „	14 „ „ „			14
		17 „ „ „			17
		22 „ „ „			26

Tabelle 3. Auflösung von Invertin und Trockensubstanz aus *warm* mit Essigester behandelter Hefe.

Nr.	Vorbehandlung	Proteolyse	Gelöste Trockensubstanz Proz.	Gelöstes Invertin Proz. bezogen auf die frische Hefe	Gelöstes Invertin Proz. bezogen auf das am Ende bestimmte
1	3 Stunden 41° nach Verfluss. bei 20°	5 Tage mit Trypsin	36	3	4
2a	3 „ 42° „ „ „ 20°	6 „ „ „	36	6	12
2b	ebenso	6 „ „ Pepsin	40	8	11
3	3 Stunden 36°	5 „ „ Trypsin	43	5	7
4	4 „ 37°	5 „ „ „	50	9	10

[131] IV. Freilegung des Invertins durch Diastase.

Nach der Entleerung durch Pepsin oder Trypsin gibt die Hefe bei der Einwirkung von Malzdiastase das Invertin frei, während zugleich eine bedeutende Menge von Hefegummi in Lösung geht.

Ebenso wirkt die Tannase[1], das aus Aspergillus niger durch toluolhaltiges Wasser ausgezogene Enzympräparat, von dem uns Herr Prof. K. FREUDENBERG freundlichst eine Probe zur Verfügung stellte. Aus 25 g entleerter Hefe (6 g Trockengewicht) entstand mit 0,1 g Tannase in 5 Tagen bei 30° eine Lösung, die vom Invertin der angewandten vorbehandelten Hefe 57% enthielt, während der übrige Teil des Invertins noch in den Heferückständen quantitativ erhalten war. In dem Auszuge, der an Trockensubstanz 22% vom Gewicht der vorbehandelten Hefe enthielt, begleitete viel reduzierender Zucker das Invertin.

Dieses Ergebnis wurde durch Anwendung von Diastase noch übertroffen. Wir verdankten die diastatischen Malzextrakte, mit denen wir arbeiteten, der Diamalt-Aktien-Gesellschaft in München, deren Direktor, Herrn L. GRAF, wir für die Überlassung der Präparate verbunden sind. Von dem syrupösen Diastasepräparat, das nach Vergärung mit Bierhefe und Eindunsten etwa ein Zehntel seines Gewichts als Trockenrückstand lieferte, ließen wir 1 g, in 100 ccm Wasser gelöst, bei 30° auf je 25 g der

[1] A. FERNBACH, Compt. rend. **131**, 1214 [1900]; H. POTTEVIN, ebenda **131**, 1215 [1900]; K. FREUDENBERG, Ber. d. d. chem. Ges. **52**, 177 [1919].

feuchten, zuerst mit Essigester in der Wärme, dann mit Pepsin oder Trypsin vorbehandelten Hefe einwirken. Das Volumen der Flüssigkeit, die mit Toluol überschichtet und gerührt oder häufig bewegt wurde, hielten wir konstant und ermittelten durch Entnahme von Proben und quantitative Bestimmung den Gang der Auflösung des Invertins. Die Diastase erlitt Abschwächung und [132] Zerstörung während des Versuches. Bei der Isolierung des Invertins in größerem Maßstab wurde nach einigen Tagen von neuem Diastase zugefügt. Am Ende der Versuche, nach 5 bis 6 Tagen, waren die Heferückstände leichter als Wasser; die Filtrate waren wenig gefärbt, sie enthielten nach Abzug des Diastasetrockengewichts ungefähr ein Drittel der Trockensubstanz der angewandten vorbehandelten Hefe, also ein Zehntel von derjenigen der frischen Hefe. Das Invertin war, wie die Beispiele der Tab. 4 zeigen, zum großen Teil oder ganz in Lösung gegangen, wobei allerdings in einigen Fällen, besonders Versuch 3, erheblicher Invertinverlust eingetreten war. Die auf den Trockenrückstand bezogenen Zeitwerte der Auszüge waren 50 bis 80 gegenüber den Zeitwerten 160 bis 206 unserer durch Autolyse gewonnenen Hefeauszüge, besaßen also dreimal größeren Reinheitsgrad. Die Invertinlösungen waren reich an Hefegummi und sehr arm an Eiweißstoffen, sie gaben nur ganz geringe Millonsche Reaktion.

Tabelle 4. Auflösung des Invertins mit Diastase aus proteolytisch entleerter Hefe.

Nummer	Trockengewicht der angew. vorbeh. Hefe	Trockengewicht des diastat. Auszugs g	Trockengewicht des diastat. Auszugs Proz.	M.Z.Q. der angew. entleerten Hefe	M.Z.Q. des diastat. Auszugs	Gelöst. Invertin Proz.
1 (siehe Nr. 1 der Tab. 3)	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
2 („ „ 2 „ „ 2)				[illegible]	[illegible]	[illegible]
3 („ 3 „ „ 3)	[illegible]	211	[illegible]	114	[illegible]	[illegible]
4 („ 4 „ „ 3)	600	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[133] **B. Invertin aus der fraktionierten Auflösung der Hefe.**

I. Darstellung durch proteolytische und diastatische Entleerung der Hefe.

Vorbehandlung mit Essigester. Die Ausschaltung des Invertin freilegenden Enzyms geschah durch Einwirkung von Essigester in der Wärme. Wir verarbeiteten (4. I. 21) 10 kg gewaschene Hefe der Löwenbrauerei (Trockengewicht 2,44 kg), deren Invertinzeitwert 290 betrug. Die Hefe wurde über Nacht im Brutschrank (34°) in drei Filtrierstutzen angewärmt. Dann senkten wir diese in drei große Wasserbäder ein, deren Temperatur zwischen 37 und 39° gehalten wurde, und verrührten die Hefe mit $2^1/_2$ l auf 37° vorgewärmtem Essigester. Die rasch verflüssigte Hefe hielten wir 3 Stunden bei 37° und ließen sie über Nacht abkühlen. Dann wurde in einer Überlaufzentrifuge die sich schwer absetzende Hefe vom Verflüssigungssaft getrennt und gewaschen. Der Verflüssigungssaft enthielt nach seinem Zeitwert 1700 vom Invertin der angewandten Hefe 17%, und zwar so viel, weil bei dem langsamen Anwärmen der Hefe die enzymatische Freilegung in beträchtlichem Maße zur Wirkung gelangt

war. Von der Trockensubstanz der Hefe waren 24%, nämlich 580 g, ausgetreten (Anhang Nr. 3).

In einem anderen Beispiel (21. I.) mit 10 kg Hefe (Trockengewicht 2,10 kg) vom Invertinzeitwert 218 kürzten wir das Anwärmen der Hefe auf 3 Stunden ab; infolgedessen gingen nur 5,8% des Invertins mit dem Freilegungssaft (Zeitwert 3760) verloren, der 470 g, d. i. 22½% von der Hefesubstanz weggelöst hatte (Anhang Nr. 9).

Proteolyse. Die abgetötete Hefe verteilten wir mit 10 l Wasser unter Zusatz von Toluol und von 300 g kryst. Natriumacetat auf zwei Pulverflaschen und erwärmten mit 100 g des oben erwähnten Pankreaspräparates 5 Tage lang im Brutschrank auf 30 bis 34°. Nach der [134] Essigesterbehandlung fanden wir noch 83% vom ursprünglichen Invertin in der Hefe, am Ende der Trypsineinwirkung noch 68%, während 7% beim Eiweißabbau in die Lösung übergegangen waren. Der Trockenrückstand derselben (ohne Diastase und Natriumacetat) betrug 1050 g, entsprechend 43% von dem der frischen Hefe, so daß im ganzen 67% der Inhaltsstoffe entleert waren (Anhang Nr. 4).

Die entleerte Hefe wurde in der Klärzentrifuge von dem proteolytischen Auszug wieder abgetrennt und wiederholt gewaschen.

Im zweiten Versuche wies die entleerte Hefe noch 85% vom Invertin des Ausgangsmaterials auf, während 9% beim Eiweißabbau ausgetreten waren. Die tryptische Entleerung der Hefe hatte 1040 g Trockensubstanz beseitigt, d. i. 50% von derjenigen der Hefe, wozu noch die 22½% des Verflüssigungssaftes zu rechnen sind (Anhang Nr. 10).

Diastatische Freilegung. Zur Auflösung des Invertins diente ein diastatischer Malzextrakt, den wir entsprechend dem Verfahren, das S. FRÄNKEL und M. HAMBURG[1] und E. PRZIBRAM[2] zur Reinigung der Diastase angaben, zunächst von gärfähigem Zucker befreiten. Zu diesem Zwecke ließen wir die Lösung von 100 g Diastasepräparat in 1½ l Wasser mit 50 g Bierhefe 2 Tage bei 10 bis 12° gären und unter Zusatz von 20 g gefälltem Calciumcarbonat noch einen halben Tag bei 25°. Dabei erlitt das Enzym keine starke Abschwächung; 0,5 ccm bewirkten z. B. bei Zimmertemperatur in 5 ccm 0,5 proz. Stärkelösung Rotfärbung in 9 Minuten (gegenüber 7 Minuten vor der Gärung). Nach Beendigung der Gärung wurde die Lösung durch Einengen im Vakuum von Alkohol befreit. Mit dieser Diastase versetzten wir die Suspension (17 l) der Heferückstände nach der Trypsinbehandlung und hielten unter häufigem Schütteln und bei Gegenwart von [135] Toluol die Temperatur 6 Tage auf 30°. In dieser Zeit verschwand die Diastase, während erst 40% der erwarteten Invertinmenge gelöst waren. Darauf fügten wir eine weitere Menge der Diastase hinzu, 40 g des Präparates, die wir durch Dialyse statt durch Vergärung von beigemengtem Zucker befreit hatten. In zwei weiteren Tagen stieg das gelöste Invertin auf 54, in einem dritten Tag auf 57% des nach der Proteolyse noch vorhandenen an. Es zeigte sich nun, daß auch die Hefe-

[1] Hofm. Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **8**, 380 [1906].
[2] Biochem. Zeitschr. **44**, 293 [1912].

rückstände kein Invertin mehr enthielten, daß also das vorhandene Invertin ganz in Lösung gegangen war. So traten manchmal und unregelmäßig während der langen Einwirkung von Pankreasenzym und nach derselben und bei der Behandlung mit Diastase kleinere und größere Verluste an Invertin ein, die noch nicht erklärt werden können.

In dem invertinhaltigen Auszug, der von den Heferückständen abfiltriert war, konnte man keine Diastase mehr nachweisen. Die schwachgelbe Lösung, 17¹/₂ l, enthielt 211 g Trockensubstanz, entsprechend 6% vom Trockengewicht der frischen Hefe und 32% von ihrem Invertin (M.Z.Q. 53,6 gegenüber 107 von frischer Hefe). Der Invertinzeitwert des Auszugs, auf Trockensubstanz bezogen, betrug 78 (Anhang Nr. 5).

Die Lösung enthielt nach dem schönen und reichlichen Niederschlag mit Fehlingscher Lösung viel Hefegummi und etwas reduzierenden Zucker. Andererseits gab sie weder mit Ferrocyankalium und Essigsäure, noch mit Bleiacetat eine Fällung und mit Millonschem Reagens nur schwache Rotfärbung.

In dem zweiten Beispiel brachte die achttägige Einwirkung der Diastase 80% des noch vorhandenen Invertins in Lösung, und 68% (d. i. 37%, bezogen auf die frische Hefe) waren im Filtrat von den Heferesten noch enthalten. Der Auszug enthielt 1,6 g Trockensubstanz und hatte, auf diese bezogen, den Zeitwert 55 (Anhang Nr. 11).

[136] II. Reinigung nach dem Adsorptionsverfahren.

Die Untersuchung hat ergeben, daß auf die neuen Invertinlösungen, die in ihrer Zusammensetzung von den durch Autolyse gewonnenen Hefeauszügen wesentlich abweichen, die vor kurzem beschriebenen Methoden der Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und mit Kaolin zur Steigerung des Reinheitsgrades anwendbar sind. Auch hier ist die Annahme der bei Bildung und Zerlegung der Adsorbate wirkenden Koadsorbentien und Koeluentien, womit sich in der I. Abhandlung die verwickelten und widerspruchsvollen Verhältnisse beim Eluieren des Enzyms erklären ließen, nicht zu entbehren. Während gewöhnlich die Adsorbate des Invertins in Aluminiumhydroxyd mit sehr verdünntem Ammoniak leicht zerlegt werden und auf diese Weise auch die Präparate der neuen Darstellung nach der ersten Adsorption glatt in Freiheit gesetzt werden, läßt sich das durch wiederholte Adsorptionsvornahmen gereinigte Präparat aus dem Tonerdeadsorbat gar nicht mehr durch Ammoniak isolieren. Es fehlt also jetzt an Koeluentien, die im Gang der Reinigung abgetrennt worden sind. Ohne ihre Mitwirkung scheint Ammoniak das Invertin nicht aus dem Adsorbate frei zu machen. Eigentümlich ist den mit Diastase dargestellten Invertinlösungen ihr großer Gehalt an Hefegummi. Daher ist hier die Methode der Trennung des Invertins vom Hefegummi durch Kaolinadsorption, zu der die erste Arbeit geführt hat, besonders wichtig. Der Hefegummi, der bei dieser Adsorption in der Mutterlauge zurückbleibt, wird gewöhnlich mit einem Male abgetrennt, allerdings diesmal, wo seine Menge so bedeutend ist, nur zum größten Teile, nicht vollständig. Daher ergibt sich für solche Fälle die Notwendigkeit, die Adsorption mit Kaolin zu wiederholen.

Vorreinigung mit Kaolin. Die Klärung mit Kaolin, die gewöhnlich zur Entfernung von Eiweiß angewandt wird, ist auch hier von Nutzen. Die Millonsche Reaktion wird zum Verschwinden gebracht und die [137] Xanthoproteinprobe erscheint danach abgeschwächt. Das Invertin wird in dem gegebenen Reinheitsgrad noch nicht von Kaolin adsorbiert, wenigstens aus rein wäßriger Lösung; daher verläuft diese Vorbehandlung ohne Verlust.

Das erste Präparat, 17 l (M.Z.Q. 52,3), wurde mit 1,7 kg Kaolin verrührt und über Nacht stehen gelassen. Der Zeitwert der Lösung, auf Trockengewicht bezogen, verbesserte sich von 78 auf 72. Das Kaolin blieb milchig verteilt und war schwierig filtrierbar; 14 l Filtrat ergaben noch M.Z.Q. 44,5.

Adsorption mit Aluminiumhydroxyd. In der mit Kaolin gereinigten Lösung war das Invertin auf Zusatz von 40% Aceton noch genügend beständig (während 7 Stunden zeigte eine Probe keine Abnahme), so daß die Adsorption unter den in der I. Abh., C, II 1 angegebenen Bedingungen ausgeführt werden konnte. Wir versetzten das Filtrat vom Kaolin mit 5,6 l Aceton und behandelten es mit 83 g Aluminiumhydroxyd, d. i. 4/5 der zur vollständigen Adsorption nötigen Menge. Das in der Zentrifuge abgetrennte und einmal gewaschene Adsorbat wurde in 3 l Wasser verteilt und durch Zusatz von 30 ccm 10proz. Ammoniak zerlegt. Die Elution lieferte beim Einengen im Vakuum auf 100 ccm und Fällen bei 0° mit dem gleichen Volumen Aceton das Invertin in guter Ausbeute (M.Z.Q. 20, d. i. 65% von dem der geklärten Lösung), aber in noch sehr verdünntem Zustand: 20,4 g vom Zeitwert 14, ein Präparat, das zum größten Teil aus Hefegummi bestand. In der Mutterlauge der Acetonfällung waren nur 2,3 g Substanz zurückgeblieben. Bei Wiederholung des Versuches konnte daher die Fällung mit Aceton unterbleiben; der Zeitwert des zweiten Präparates, 7,3, ergab sich dann aus dem Trockengewicht einer Probe (Anhang Nr. 6).

Adsorption mit Kaolin. Das Präparat vom Zeitwert 14, 10 g, schlämmte man mit 1 l Wasser unter Zusatz von 20 ccm 2n-Essigsäure an und erzielte mit 159 g Kaolin fast vollständige Adsorption. Das Adsorbat wurde zur [138] Zerlegung in 1,8 l Wasser bis zur alkalischen Reaktion mit 2n-Soda versetzt, wovon 15 ccm erforderlich waren. Nach dem Einengen, der Dialyse, die mit einem Verlust von fast 30% verlief, und dem Abdunsten bestand die Ausbeute (M.Z.Q. 14,1) in 0,97 g Invertin vom Zeitwert 1,7 und (aus einer zweiten Elution) 0,38 g vom Zeitwert 2,8 (Anhang Nr. 7).

Wiederholte Adsorption mit Aluminiumhydroxyd. Die Hauptmenge des Präparates (M.Z.Q. 11,7) absorbierten wir erneut mit Tonerde, und zwar nun mit Rücksicht auf die gesteigerte Empfindlichkeit des reineren Präparates aus acetonfreier Lösung. Diese nochmalige Adsorption erforderte 15,7 g Aluminiumhydroxyd, d. i. viel weniger, als beim ersten Male unter gleichen Bedingungen nötig gewesen wäre, andererseits war das Adsorbat viel schwerer zerlegbar. Wir erzielten die Elution (M.Z.Q. 6,3) mit 1proz. Diammonphosphat und gewannen nach dem Einengen und dreitägiger Dialyse gegen fließendes destilliertes Wasser 0,396 g Invertin vom Zeitwert 1,43 (M.Z.Q. 5,5) (Anhang Nr. 8).

Im zweiten Beispiel erforderten 1,230 g aus Kaolinadsorbat isoliertes Invertin vom Zeitwert 2,33 zur wiederholten Adsorption sogar nur 7,0 g Aluminiumhydroxyd. Das gleichfalls mit Ammonphosphat mit einer Ausbeute von 83% eluierte Präparat wies den Zeitwert 1,0 auf (Anhang Nr. 12).

III. Zur Beschreibung des Invertins.

Die neuen Invertinpräparate sind in Wasser leicht und farblos oder fast farblos löslich und hinterlassen nur eine Spur von unlöslichem Rückstand. Bei trocknem Erhitzen zersetzen sie sich unter schwachem Aufblähen und geringer Entwicklung von Dämpfen; bei stärkerem Erhitzen geben die Dämpfe eine sehr schwache, nichtssagende Pyrrolreaktion. Beim Erhitzen mit Kalilauge bräunen die Dämpfe sofort Curcumapapier; dann wird nochmals bei völligem Einkochen zur Schmelze reichlich Ammoniak entwickelt.

[139] Diese Präparate geben nicht die mindeste Reaktion von Eiweiß und seinen Abbauprodukten. Also die Koagulierungs- und Fällungsproben und die Biuret- sowie die Millonsche Reaktion sind völlig negativ. Es bleibt nur stets eine an die Xanthoproteinprobe erinnernde Reaktion bestehen: nämlich beim Erhitzen mit Salpetersäure bleibt die Lösung zwar ganz farblos, sie gibt aber dann beim Alkalischmachen einen rein gelben Farbton.

Die einzige Verunreinigung, die dem mit Diastase isolierten Invertin durch die Adsorbate hindurch folgte und in den Präparaten noch nachgewiesen werden kann, ist Hefegummi. Daher fällt die Probe von Molisch positiv aus, mit Fehlingscher Lösung entsteht ein wenig Niederschlag, beim Erhitzen mit 20proz. Salzsäure wird reduzierender Zucker gebildet. Allein andere, schon in der ersten Abhandlung beschriebene Präparate, sind völlig frei von Hefegummi und von Pentosen, überhaupt von Kohlehydrat.

Die Fällungsmittel, mit denen die früheren Präparate zum Teil noch schwache Ausflockungen geliefert hatten, z. B. die Reagentien für Alkaloide und Purine, geben mit der 1/2proz. Lösung keine Niederschläge, also Tannin, Phosphorwolframsäure, Quecksilberchlorid, Uranylacetat, ammoniakalische Silberlösung, Bleiacetat, sogar basisches Bleiacetat.

Die chemische Eigenart des Enzyms ließ sich nicht mit einfachen bekannten Mitteln aufdecken.

Einige Bemerkungen über die Zusammensetzung des Invertins seien mit dem besonderen Vorbehalt angeführt, daß sie nur die Präparate kennzeichnen, deren Reinigung nicht beendet ist.

Das Invertin, wie es bisher erhalten wurde, hinterläßt bedeutenden Glührückstand. Er beträgt z. B. 7,0 und 12,0% bei den neuen Präparaten von den Zeitwerten 1,0 und 1,4, während die in der I. Abhandlung beschriebenen Präparate von den Zeitwerten 0,73 und 0,86 sogar 44,8 und 21,6% Asche lieferten. Indessen gelang [140] es, aus den durch Autolyse dargestellten Hefeauszügen durch die Tonerde- und

Kaolinadsorbate auch aschеärmere Präparate zu gewinnen, z. B. eines vom Zeitwert 1,0 mit 3% Glührückstand.

Das letztere enthält 5,2% Stickstoff. Das neue Präparat vom Zeitwert 1,4, das noch hefegummihaltig ist, enthält nur 4,0% N und, auf aschefreie Substanz berechnet, 41,7 C und 7,1 H, während das durch den Zeitwert 1,0 gekennzeichnete ähnliche Präparat 44,3 C aufweist.

Die Elementaranalyse unserer besten früheren Präparate, auf aschefreie Substanz berechnet, ergibt folgende Werte, die an die Zusammensetzung der Polyosen merkwürdig erinnern:

Präparat vom Zeitwert	0,73	C 44,5,	H 6,4
„ „ „	0,86	C 43,9,	H 6,4.

Alle diese Präparate weisen Phosphor in organischer, gegen Salpeterschwefelsäure recht widerstandsfähiger Bindung auf; es sollen aber erst in einer folgenden Mitteilung über den Phosphor im Invertin nach weiterer Steigerung des Reinheitsgrades quantitative Angaben mitgeteilt werden. Indessen finden wir diese Frage, noch ehe wir unsere Arbeit zum Druck abgeschickt, schon in einer neuen Untersuchung von H. v. EULER und O. SVANBERG[1] behandelt. Der Phosphorgehalt gereinigter Saccharaselösungen erweist sich nach v. EULER und O. SVANBERG in zwei Beispielen beinahe proportional der Inversionsfähigkeit. In dialysierten Präparaten, die noch Hefegummi entsprechend einer Hexosenausbeute von 91% enthalten, werden 0,16 bis 0,19% P (neben 1,58 und 1,27% N) ermittelt, was einem Phosphorgehalt von 1,0 bis 1,2% (neben 9,9 bis 7,9% N) in hefegummifreien Präparaten entspricht. Diesen Phosphorgehalt des Invertins führen v. EULER und SVANBERG auf Nucleinsäuregruppen zurück.

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **112**, 282 [1921].

[141]

Anhang[1].

Nr.	Enzymmaterial	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1 a)	Hefe, frisch, 25proz.	0,5 g			[illegible]	[illegible]	
b)	Hefe, zerrieben, nicht filtriert	0,5 g	[illegible]	[illegible]		[illegible]	
			[illegible]	[illegible]		[illegible]	
c)	Hefe, zerrieben, filtriert	0,5 g	[illegible]	[illegible]			
			[illegible]	[illegible]		[illegible]	
2 a)	Hefe, frisch, 5 g	0,5 g	[illegible]	[illegible]			[illegible]
b)	100 ccm Hefeauszug	5 ccm	[illegible]	[illegible]			[illegible]
			[illegible]	[illegible]			
c)	50 ccm zerriebene, abfiltrierte Hefe, 25 ccm Hefeauszug enthaltend	0,25 ccm	[illegible]	[illegible]			[illegible]
			[illegible]	[illegible]			
3 a)	Hefe, frisch, 10 kg	0,5 g	[illegible]	[illegible]		[illegible]	
b)	7500 ccm Verflüssigungssaft	2,5 ccm	[illegible]	[illegible]		[illegible]	
4 a)	16700 ccm Hefeaufschlämmung, vor der Proteolyse	1,25 ccm	[illegible]	[illegible]		[illegible]	
b)	Dieselbe, nach der Proteolyse	1,25 ccm	[illegible]	[illegible]		[illegible]	
c)	16 l proteolytische Lösung	2,5 ccm	[illegible]	[illegible]		[illegible]	
5	17¹/₂ l Invertinlösung	5 ccm	[illegible]	[illegible]			[illegible]
6	20,38 g Präparat	[illegible] g	[illegible]	[illegible]			[illegible]
7 a)	0,97 g 1. Präparat	[illegible] g	[illegible]	[illegible]			[illegible]
b)	0,38 g 2. Präparat	[illegible] g	[illegible]	[illegible]			[illegible]
8 a)	570 ccm Elution	1,25 ccm	[illegible]	[illegible]			[illegible]
b)	0,076 g Präparat	[illegible] g	[illegible]	[illegible]			
			[illegible]	[illegible]			[illegible]
9 a)	Hefe, frisch, 10 kg	0,5 g	[illegible]	[illegible]		[illegible]	
b)	8,5 l Verflüssigungssaft	5 ccm	[illegible]	[illegible]		[illegible]	
10 a)	13,5 l proteolyt. Hefeaufschlämmung	1,25 ccm	[illegible]	[illegible]			[illegible]
b)	13 l proteolyt. filtrierte Lösung	2,5 ccm	[illegible]	[illegible]			[illegible]
11 a)	11 l diastatische Hefeaufschlämmung	1,25 ccm	[illegible]	[illegible]			[illegible]
b)	Eine Probe von a) filtriert	1,25 ccm	[illegible]	[illegible]			
c)	13,6 l Filtrat	2,5 ccm	[illegible]	[illegible]			[illegible]
12 a)	1,236 g Präparat aus Kaolin	[illegible] g	[illegible]	[illegible]			[illegible]
b)	610 ccm Elution aus Al(OH)₃	1,25 ccm	[illegible]	[illegible]			[illegible]
c)	0,26 g Endpräparat	[illegible] g	[illegible]	[illegible]			[illegible]
			[illegible]	[illegible]			

[1] Um den Umfang der Abhandlung einzuschränken, führen wir nur die experimentellen Belege der Hauptversuche an.

Zeitschrift für physiologische Chemie **116**, S. 53 (1921).

47. BEMERKUNGEN ÜBER DIE ELUTION VON SACCHARASE UND MALTASE AUS IHREN ADSORBATEN.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und RICHARD KUHN.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Mit 1 Abbildung im Text.)

(Der Redaktion zugegangen am 15. Juni 1921.)

In einer Abhandlung von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE „Zur Kenntnis des Invertins", die im Herbst vorigen Jahres in den Annalen der Chemie zum Druck gegeben wurde, behandelt ein Kapitel „Die Adsorption des Invertins und die Elution aus den Adsorbaten". Darin wurde auch der Einfluß untersucht, den die Begleitstoffe auf das Verhalten des Enzyms ausüben. Es zeigte sich, daß die Adsorbierbarkeit des Invertins von seinem Reinheitsgrade abhängig ist. Während nach L. MICHAELIS[1] Invertin nur von elektropositiven Mitteln adsorbiert wird, gelingt es, mit Tonerde gereinigtes Invertin mit elektronegativen Mitteln wie Kaolin glatt zu adsorbieren. Noch mehr als das Adsorptionsverhalten wird aber die Beständigkeit der Adsorbate durch die Begleitstoffe bestimmt. Dieser Einfluß macht sich bei dem für präparative Anwendung wichtigen Versuche geltend, die Adsorptionsverbindungen des Enzyms zu zerlegen. Manche Adsorbate enthalten Begleitstoffe, durch deren Beseitigung erst die Elution des Invertins ermöglicht wird, andere enthalten Begleiter, deren Beseitigung die Elution von Invertin verhindert. Dem Adsorbate können also Stoffe entzogen werden, die beim Eluieren mitwirken, oder es [54] kann zusammen mit dem Invertin Stoffe enthalten, die dieses fest an das Adsorbens binden.

In jener Untersuchung wurden zur Überwindung der kleinen Affinitätsbeträge, die in den Adsorbaten wirken, einfache chemische Mittel angewandt, nämlich sehr verdünnte Alkalien, Ammoniak von 0,01 bis 0,1 % oder sekundäres Alkaliphosphat. Auch fanden WILLSTÄTTER und RACKE, daß Rohrzucker zusammen mit Mononatriumphosphat das Invertin quantitativ aus dem Adsorbate eluiert.

Die eluierende Wirkung des Rohrzuckers, und zwar desselben allein, war schon zuvor von O. MEYERHOF[2]) entdeckt worden, dem es gelungen war, vom Invertin, das mit

[1] Biochem. Zs. Bd. 7, S. 488 [1907/08].

[2]) Pflügers Arch. Bd. 157, S. 251 [1914], und zwar S. 271.

Eisenhydroxyd niedergeschlagen war, bis zu drei Vierteln mit 4proz. Rohrzuckerlösung freizulegen. Die Beobachtung von MEYERHOF wird in einer vor kurzem erschienenen Abhandlung von L. MICHAELIS[1] erörtert und in einem Kapitel „Über die Ablösung adsorbierter Invertase" fortgeführt. Da wir im Anschluß an die Arbeit von WILLSTÄTTER und RACKE Versuche in gleicher Richtung vorwiegend zu präparativen Zwecken unternommen hatten, veranlaßt uns die Veröffentlichung von L. MICHAELIS, Ergänzendes aus unseren Beobachtungen mitzuteilen, zumal diese in manchen Punkten zu dem Bekanntgewordenen in Widerspruch stehen. Gewisse Widersprüche dürften darauf beruhen, daß auch diese Elutionserscheinungen von der Natur der Adsorbate, von ihrem Gehalt an Begleitstoffen, wesentlich abhängig sind. Aus dem gleichen Grund waren auch von unseren eigenen Beobachtungen über Elutionen einige nicht reproduzierbar.

In der angeführten Abhandlung hat L. MICHAELIS in qualitativen Versuchen geprüft, welche Zucker überhaupt imstande sind, Invertin vom Eisenhydroxyd abzulösen. Während nach 20stündiger Einwirkung keine Ablösung durch Glucose, Fructose, Mannose, Lactose, α- und β-Methylglucosid eingetreten war, zeigte sich Ablösung durch Saccharose, Raffinose und [55] Maltose. Daraus folgert MICHAELIS, „daß dieser Vorgang nichts zu tun hat mit der spezifischen Fermentwirkung".

Auch wir finden im Verhalten der Enzymadsorbate gegen die Zucker keine Regelmäßigkeit und können keine besondere Beziehung zwischen den Enzymen und ihren Substraten erkennen. Dem Verhalten der adsorbierten Saccharase gegen Saccharose entgegengesetzt ist das Verhalten der Maltase. Aus Tonerdeadsorbaten vermochten wir sie durch Maltose auch nicht spurenweise zu eluieren. Dagegen ging sie bei gleichzeitiger Gegenwart von Phosphat reichlich in Lösung.

Einen bedeutenden Unterschied gibt es nach unseren Bestimmungen auch bei Invertinadsorbaten zwischen der Wirkung der Zucker und der Kombination von Zucker + Puffer. Während Rohrzucker langsam und unvollständig eluiert, wird das Invertin aus dem Tonerdeadsorbat durch Rohrzucker (16proz. Lösung) zusammen mit Mononatriumphosphat (1 prozentig gelöst) in einigen Minuten quantitativ eluiert. Ebenso wirkt der Zusatz einer Phosphatmischung von $p_H = 7$, während allerdings mit einem geringeren Zusatz dieses Puffers nur teilweises Herauslösen stattfindet. Es handelt sich weder um die für die Invertinwirkung optimale Wasserstoffionenkonzentration, die durch den Puffer eingestellt wird, noch auch um eine spezifische Phosphatwirkung. Das Mononatriumphosphat ließ sich ohne Änderung des Effektes durch Citratpuffer von $p_H = 4.5$ ersetzen, hingegen nicht durch Essigsäure oder Acetatpuffer von $p_H = 4.5$. Durch diesen Zusatz wird sogar die eluierende Wirkung, die dem Rohrzucker allein eigen ist, gänzlich oder zum großen Teil aufgehoben.

Außer mit den in präparativem Maßstab von WILLSTÄTTER und RACKE angewandten sekundären Alkaliphosphaten beobachten wir auch mit primärem Phosphat Elutionswirkung, aber weit schwächere. Zusatz von Rohrzucker oder anderen Zuckern

[1] Biochem. Zs. Bd. 115, S. 269 [1921].

in geringer Konzentration vermag diese Wirkung nicht zu steigern. Dagegen kam es — leider nicht regelmäßig — vor, daß von Glycerin, und zwar schon in äußerst geringer Konzentration, z. B. 10 $^{-4}$%, die Elutionswirkung des primären Phosphates bedeutend gesteigert wurde.

[56] Wie Rohrzucker in großer Konzentration zusammen mit Phosphat die Adsorbate vollständig zerlegt, so wird durch Mononatriumphosphat zusammen mit viel Maltose das Invertin ebenfalls reichlich eluiert. Aber konzentrierte Maltoselösung allein eluiert aus unseren Tonerdeadsorbaten das Invertin gar nicht. Dieses Ergebnis läßt die Wirkung des Rohrzuckers doch etwas spezifischer erscheinen als die Beobachtung von L. MICHAELIS[1], daß Maltose wie Saccharose die Ablösung des Invertins herbeiführe.

Der Widerspruch dürfte ähnlich zu erklären sein wie die Abweichungen, die wir im Verhalten anderer Adsorbate fanden. Invertinhaltige Bleiacetatfällungen, die einen Teil des Enzyms an verdünntes Ammoniak abgaben, erwiesen sich in Versuchen, die Fräulein J. GRASER ausführte, als gänzlich unzerlegbar sowohl durch Rohrzucker allein als auch durch Rohrzucker + Phosphat. Andererseits ließ sich ein Tonerdeadsorbat, das keine Spur der weitgehend gereinigten Saccharase an NH_3 abgab, durch Rohrzucker + Phosphat ebenso quantitativ eluieren wie ein durch NH_3 leicht zerlegbares aus Rohinvertin.

Es scheint, daß durch den Einfluß der in den Adsorbaten vorkommenden verschiedenartigen Begleitstoffe das Elutionsverhalten noch verschleiert und daß das Verhalten der Adsorbate auch gegen die Zucker von ihrem Reinheitsgrade beeinflußt wird.

Experimenteller Teil.

Verhalten der Invertinadsorbate gegen Rohrzucker + Phosphat.

Die verwendete Saccharaselösung war aus 1 Teil untergäriger Bierhefe der Löwenbrauerei in München + 2 Teilen Wasser durch rasche Autolyse unter Toluolzusatz gewonnen und mit 10% Kaolin geklärt. Die Bestimmung ihrer enzymatischen Wirksamkeit — gemessen unter den durch H. v. EULER[2] vorgeschlagenen Bedingungen — ergab, daß 2,5 ccm in 25 ccm Bestimmungslösung (16% Rohrzucker, [57] 1% NaH_2PO_4, 15,5°) die vorhandene Zuckermenge in 75,5 Minuten bis zur Nulldrehung zu invertieren vermochten. Wir beobachteten nämlich bei zwei Proben, die nach 35 und 55 Minuten mit $^1/_5$ Vol. 2n-Soda gestoppt wurden, im 2dm-Rohr eine Drehungsabnahme von 10,50 bzw. 14,04° entsprechend 45 und 64% Spaltung. Nach der von C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON[3]) für den zeitlichen Verlauf der Saccharasewirkung angegebenen Kurve berechnet sich daraus die für einen Umsatz von 75,75% nötige Zeit zu 75,5 und 75,5 Minuten. 1 Teil einer Suspension von Aluminiumhydroxyd (Trockengewicht von 10 ccm, auf dem Wasserbad bestimmt — 0,4225 g) genügte, um fast das gesamte

[1] Biochem. Zs. Bd. 115, S. 269 [1921], und zwar S. 270.
[2] Diese Zs. Bd. 69, S. 169 [1910]; Bd. 73, S. 336 [1911]; Bd. 107, S. 273 [1919].
[3]) Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 [1890], und zwar S. 844.

Enzym aus 1 Teil des Hefeauszugs aufzunehmen. Wegen der geringeren Haltbarkeit des Invertins im Adsorbat wurden nur die für die Versuche von 1 bis 2 Tagen jeweils nötigen Mengen der Tonerdeadsorbate nach dreimaligem sorgfältigen Waschen etwa auf das Volumen des ursprünglichen Extraktes gebracht.

Bei der Bestimmung eines solchen Adsorbates unter den eben angeführten Bedingungen beobachteten WILLSTÄTTER und RACKE[2] die Ablösung des gesamten Invertins: „Während es aus der Hefezelle vom Rohrzucker nicht herausgelöst wird, eluiert der Zucker der Bestimmungslösung das Enzym quantitativ aus dem Adsorbat." Wir können diese Angabe durchaus bestätigen.

10 ccm Adsorbat in 100 ccm bewirkten in 43,5 Minuten 10,20° Drehungsabnahme entsprechend 44% Spaltung und einer Nulldrehungszeit von 97 Minuten. In der übrigen, sofort nach Entnahme der ersten Probe abzentrifugierten klaren Bestimmungslösung, die in den Thermostaten zurückgestellt wurde, sank die Drehung weiter. Nach 60 und 77,5 Minuten vom Beginn des Versuches an beobachteten wir nämlich Drehungsabnahmen von 14,72 bzw. 15,65°, woraus sich als Nulldrehungszeiten 97 und 97,5 Min. berechnen. „Das Enzym war mindestens am Ende des ersten Zeitabschnittes quantitativ frei in Lösung." Das Ausschlaggebende hierbei ist neben der [58] Konzentration des Rohrzuckers der Phosphatgehalt der Bestimmungslösung und der Zeitpunkt des Zentrifugierens. Der Versuch gelingt in gleicher Weise mit KH_2PO_4 an Stelle des Na-Salzes, und er ist nicht etwa an die für die Invertinwirkung optimale Wasserstoffionenkonzentration gebunden.

20 ccm Adsorbat + 20 ccm $^m/_3$-Na_2HPO_4 + 10 ccm $^m/_3$-KH_2PO_4 + 16 g Rohrzucker auf 100. In 22,5 Minuten 6,22° Drehungsabnahme = 26,6% Spaltung. Im Zentrifugat nach 37 und 53 Minuten 9,05 und 12,00° Drehungsabnahme entsprechend 38,7 und 51,3% Spaltung. Nulldrehungszeit für die Elution 97 bzw. 97,5 Minuten gegenüber 96,5 Minuten für das ursprüngliche Reaktionsgemisch[1].

Bei einer 35 mal geringeren Konzentration des Phosphatpuffers war bei einem Spaltungsgrad von ungefähr 42,5% nur $^1/_4$ der vorhandenen Saccharase in Lösung.

[illegible] ccm Adsorbat + [illegible] ccm $^m/_3$-Na_2HPO_4 + [illegible] ccm $^m/_{15}$-KH_2PO_4 + 16 g Rohrzucker auf 100. In 66 Minuten 40,3% Spaltung; in der 3 Minuten darauf abzentrifugierten Zuckerlösung [illegible] Minuten nach Versuchsbeginn 44,[illegible]% Spaltung.

Ebenso unvollständig bleibt die Wirkung des Rohrzuckers, wenn man von einem Pufferzusatz ganz absieht.

Nach 51,5 Minuten 7,22° Drehungsabnahme ([illegible]% Spaltung). [illegible] Minuten nach Versuchsbeginn betrug sie in der 3 Minuten nach der ersten Probeentnahme abzentrifugierten Lösung [illegible] (33,4%). Hier befand sich nur der fünfte Teil des Enzyms in Lösung.

Die elutionsfördernde Wirkung der Phosphate finden wir bei Citratgemischen wieder. Auch hier wurde bei genügendem Zusatz dieses Puffers, der eine Wasserstoffionenkonzentration von etwa $6{,}3 \cdot 10^{-[illegible]}$ erzeugte, durch den Rohrzucker dem $Al(OH)_3$ die Gesamtmenge der Saccharase entrissen.

[2] Liebigs Ann. der Chem. im Druck (I. Abh. Abschn. B. III [illegible]).

[1]) Nach L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN, Biochem. Zs. Bd. [illegible] S. [illegible] [1911] ist die Kinetik der enzymatischen Rohrzuckerspaltung vom p_H unabhängig.

Puffer: 24 ccm 0,1 n-Na Citrat + 16 ccm 0,1 n-HCl auf 100. In 30 Minuten 8,05° Drehungsabnahme (34,5% Spaltung). Im Zentrifugat nach 60 und 80 Minuten 11,02 und 14,12° (47,3 bzw. 60,5%). Nulldrehungszeiten **118, 121** und **120** Minuten.

[59] Mit 8 mal weniger Puffer — bezogen auf dieselbe Menge Aluminiumhydroxyd — fanden wir bei 45 proz. Umsatz der vorhandenen Rohrzuckermenge nur 1/4 des Invertins in Lösung. Nach 19 Minuten 10,30° Drehungsabnahme (44,2%). Zeit bis zur Nulldrehung 42 Minuten. Für die abzentrifugierte Bestimmungslösung berechnet sich aus den nach 30,3 und 56,3 Minuten beobachteten Drehungsabnahmen von 13,36 und 14,62° (57,2 und 62,7% Spaltung) eine Nulldrehungszeit von 173 Minuten. Der Vergleich dieser Werte, die den wirksamen Enzymmengen umgekehrt proportional sind, ergibt eine Ablösung von 24%.

Den Phosphat- und Citratgemischen scheint eine spezifische Aufgabe im Elutionsmechanismus zuzukommen. Laßt man nämlich die invertinhaltige Tonerde bei Gegenwart eines Acetatpuffers oder von verdünnter Essigsäure allein auf den Rohrzucker einwirken, so geht überhaupt kein Enzym in Lösung.

a) 10 ccm $Al(OH)_3$-Adsorbat + 5 ccm n/5-Essigsäure + 5 ccm n/5-Natriumacetat + 16 g Rohrzucker auf 100. Nach 43,5 Minuten 8,47° Drehungsabnahme (36% Spaltung). Zeit bis zur Nulldrehung 123,5 Minuten. In der klaren abzentrifugierten Zuckerlösung betrug die Drehung nach weiteren 31 und 54 Minuten 7,43 bzw. 7,41°.

b) 20 ccm Adsorbat + 5 ccm n/5 Essigsäure + 16 g Rohrzucker auf 100. Nach 40,5 Minuten 9,68° Drehungsabnahme entsprechend einem Umsatz von 41,5%. Im Zentrifugat, das zur völligen Klärung unter Zusatz von ganz wenig Kieselgur abgesaugt werden mußte, war α nach 63 und 120,5 Minuten vom Beginn des Versuchs an 0,92 bzw. 0,91°.

Zum Vergleich wurde das Adsorbat in üblicher Weise unter Phosphatzusatz bestimmt. Nach 68 Minuten 13,77° Drehungsabnahme (59% Hydrolyse). Im Zentrifugat, das nun ebenfalls mit Kieselgur abgesaugt wurde, war kein Enzymverlust zu bemerken. Nach weiteren 30,5 Minuten war nämlich die Drehung auf 0,55° gesunken. Die Nulldrehung wäre nach **105,5** bzw. **106** Minuten erreicht worden. Obwohl n/100-Essigsäure bei Gegenwart von Aluminiumhydroxyd der Invertinwirkung ein wenig günstiger ist als 1% primäres Phosphat, hat sich der Umsatz ausschließlich im Niederschlag vollzogen[1].

[60] Die Aktivität des an die Tonerde gebundenen Enzyms ist also von der durch das Substrat bewirkten Ablösung unabhängig. Daher laßt die Abtrennung des Aluminiumhydroxyds bei mittleren Spaltungsgraden nicht erkennen, ob die Saccharase im Experiment von WILLSTÄTTER und RACKE schon von Anfang an in gelöstem Zustand wirkte. Das ist nun keineswegs der Fall.

a) 20 ccm Adsorbat in 100 ccm Bestimmungslösung: nach 78 Minuten 16,22° Drehungsabnahme entsprechend 69,5 proz. Hydrolyse. Daher Nulldrehung nach 92 Minuten.

b) Im Parallelversuch wurde die Bestimmungslösung innerhalb der ersten 5 Minuten von der Tonerde getrennt. Die Nulldrehungszeit von 129 Minuten, die sich aus der nach 77,5 Minuten beobachteten Drehungsabnahme von 13,08° berechnet, zeigt, daß noch über 30% des Enzyms im $Al(OH)_3$ zurückgeblieben waren. Die Elution der Saccharase aus dem Tonerdeadsorbat durch Rohrzucker Phosphat ist demnach ein Zeitphänomen, wie es MICHAELIS inzwischen für die Ablösung dieses Ferments von $Fe(OH)_3$ durch Rohrzucker allein gezeigt hat.

[1] Ein $Al(OH)_3$-Adsorbat anderer Darstellung gab bei Gegenwart von viel Acetatpuffer (10 ccm n/1-Essigsäure + 3,61 g Natriumacetat auf 100) 14,5% der Saccharase an 16 proz. Rohrzuckerlösung ab.

Nach 30 Minuten 5,12° Drehungsabnahme (22% Umsatz). Nulldrehungszeit 150 Minuten. In der abzentrifugierten Zuckerlösung beobachteten wir nach 45,2 und 70,5 Minuten 6,07° und 6,71° Drehungsabnahme (Hydrolysengrad = 26,0 bzw. 28,7%). Nulldrehungszeit 108,5 Minuten.

Verhalten der Adsorbate gegen andere Zucker.

Um die in Lösung gegangenen Invertinmengen auch unter anderen Bedingungen ermitteln sowie die Wirkung anderer Kohlehydrate messend verfolgen zu können, wenden wir sie in so geringer Konzentration an, daß ihre Gegenwart in der zur Bestimmung entnommenen Probe der Elution weder durch Eigendrehung noch durch Hemmung[1] der Invertinwirkung allzusehr stört. Bei größeren Konzentrationen des Elutionsmittels analysieren wir die rückständige Tonerde. Zur gegenseitigen Kontrolle der beiden Methoden führen wir die teilweise Zerlegung eines Adsorbates durch primäres Phosphat und Rohrzucker in sehr geringer Konzentration an. Nach 5½ stündiger Einwirkung bei 15,5° fanden wir 20% des Invertins in Lösung und 71% im $Al(OH)_3$.

10 ccm Adsorbat: in 43,5 Minuten [illegible] Drehungsabnahme = 44% Spaltung. Nulldrehung nach 97 Minuten.

10 ccm Adsorbat + 1 g NaH_2PO_4 + 0,032 g Rohrzucker auf 100. [61] a) 25 ccm Elution bewirkten in 164 Minuten 3,47° Drehungsabnahme (15proz. Hydrolyse). Nulldrehung nach [illegible] Minuten. b) Nach dem teilweisen Entzug der Saccharase bewirkte das gesamte sorgfältig gewaschene Aluminiumhydroxyd in 72,5 Minuten [illegible] Drehungsabnahme = [illegible]% Spaltung. Nulldrehungszeit [illegible] Minuten.

1proz. Raffinoselösung hatte nach 16stündiger Einwirkung auf unser Adsorbat keine Saccharase abgelöst. Die der Elution entnommene Probe hätte bei vollständiger Ablösung die Bestimmungsflüssigkeit in 168 Minuten bis zur Nulldrehung invertiert. Die Anfangsdrehung von 17,83° war indes nach 180 Minuten noch unverändert. Auffallenderweise besaß auch eine 1proz. Rohrzuckerlösung kein Elutionsvermögen.

20 ccm Adsorbat + 1 g Rohrzucker auf 100. Einwirkungsdauer 18 Stunden. 20 ccm Filtrat auf 100. Nach 58 Minuten α = 17,52° und nach 24 Stunden α = 17,45°.

Es ist möglich, daß auch hier während der Rohrzuckerspaltung ein Teil der Saccharase in Lösung war, um erst nach vollendeter Hydrolyse ins Aluminiumhydroxyd zurückzufallen. Wir fanden nämlich bei weitgehender Inversion der Bestimmungslösung (− 5,20° gegenüber dem Endwert − 5,65°) in der zuvor gewaschenen Tonerde 22,5% des Invertins.

Nach 76 Minuten [illegible] Drehungsabnahme = [illegible]% Spaltung. Nulldrehungszeit [illegible] Minuten gegenüber 92 Minuten für dieselbe Menge des ursprünglichen Adsorbates.

Eine eluierende Wirkung anderer Zuckerarten, die wir in 4proz. Lösung auf je 20 ccm unseres Aluminiumadsorbates im 100 ccm-Kolben einwirken ließen, war — von einer unbedeutenden Ablösung durch Glucose abgesehen — nicht feststellbar.

Tabelle 1 (Elutionsdauer 16 Stunden, [illegible])

Elutionsmittel	ccm Filtrat auf 100 ccm	Anfangsdrehung	Versuchszeit Stunden	Drehung	Versuchszeit Stunden	Drehung
Glucose	20	18,32	6	[illegible]	24	[illegible]
Fructose	20	16,36	6	[illegible]	24	[illegible]
Maltose	10	18,48	2	[illegible]	20	18,47
Lactose	15	18,08	4	[illegible]	17	[illegible]

[1] Vgl. L. MICHAELIS und Miß MENTEN, Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913].

[62] Selbst eine 16proz. Lösung von Maltosehydrat hatte nach 7 Stunden keine Saccharase abgelöst.

20 ccm Adsorbat + 16 g Maltosehydrat auf 100. 25 ccm Zentrifugat auf 100 ccm Bestimmungslösung. Anfangsdrehung 24,40°, nach 3 Stunden 24,36° und nach 18 Stunden ebenfalls 24,36°.

Verhalten von Maltaseadsorbaten gegen Maltose.

Diese Beobachtung veranlaßte uns, das Verhalten von invertinhaltigen Maltaseadsorbaten gegen Malzzuckerlösungen zu verfolgen, da ein der Saccharase analoges Verhalten der Maltase eine Fraktionierung der beiden Hefenenzyme erlaubt hätte. 16proz. Maltoselösungen entzogen aber den von uns untersuchten Tonerdeadsorbaten keine Maltase. Das Enzym bewirkte die Malzzuckerhydrolyse ausschließlich in adsorbiertem Zustand.

1. Beispiel. 100 g Frischhefe (Löwenbräu München) wurden mit 5 ccm Chloroform verflüssigt, dann 120 ccm Wasser hinzugefügt und mit 1 proz. Ammoniak gegen hellblaues Lackmuspapier neutralisiert, wozu insgesamt 56,5 ccm nötig waren[1]. Das aus 40 ccm der abfiltrierten Maltaselösung und 20 ccm $Al(OH)_3$-Suspension dargestellte Adsorbat wurde an der Zentrifuge schnell einmal gewaschen. Die gesamte Tonerde ließen wir auf 16 g Maltosehydrat in 100 ccm bei 15,5° einwirken. Eine nach 30 Minuten entnommene Probe — mit dem gleichen Volumen $^n/_1$-Soda verdünnt — drehte im 2 dm-Rohr + 19,96°, nach weiteren 30 Minuten 19,65°. Jetzt wurde ein Teil der Bestimmungslösung abzentrifugiert und in den Thermostaten zurückgestellt. Nach weiteren 6 Stunden war in der klaren Maltoselösung keine Drehungsabnahme zu konstatieren (α = 19,65°). Wohl aber hatte die Maltase im Adsorbat weiter gewirkt (α = 18,75°).

2. Beispiel. 25 g Trockenhefe (Löwenbräu, Januar 1920) + 250 ccm Wasser + Toluol. 30,5 ccm 1 proz. NH_3. Das [63] Adsorbat aus dem durch 24stündige Extraktion gewonnenen Auszug wurde wie im 1. Beispiel dargestellt. Diesmal betrug die Drehung nach 30 Minuten langer Einwirkung bei 30° 18,38° und war nach 8 Stunden auf 14,72° gesunken. Eine Probe, die wir 1 Stunde nach Versuchsbeginn abzentrifugiert hatten, drehte 18,01°, und dieser Wert war nach weiteren 6 Stunden unverändert.

Bei Wiederholung des letzten Versuchs unter gleichzeitigem Zusatz von 5 ccm $^m/_3$-KH_2PO_4 + 5 ccm $^m/_3$-Na_2HPO_4 (p_H = 6,8) ließ sich die Maltase reichlich eluieren. Drehung der Bestimmungslösung nach $7^3/_4$ Stunden 14,70°. In einem 60 Minuten nach Versuchsbeginn abzentrifugierten Teil des Reaktionsgemisches sank die Drehung im Laufe von $6^1/_2$ Stunden von 18,30° auf 15,98°.

Ebenso leicht geht auch Invertin in Lösung, wenn man der 16proz. Maltoselösung 1% primäres Phosphat hinzufügt.

Elutionsdauer 4 Stunden. Zur Analyse diente die gesamte ausgewaschene Ton-

[1] Über Maltaselösungen aus Hefe siehe R. Willstätter, G. Oppenheimer und W. Steibelt, Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 232 [1920] und R. Willstätter und W. Steibelt, Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 157 [1920].

erde; sie bewirkte in 187 Minuten 10.86° Drehungsabnahme entsprechend 40.5% Spaltung. Nulldrehungszeit 388 Minuten (107.5 Minuten für dieselbe Menge des ursprünglichen Adsorbates). Wir fanden nur 27.5% des Enzyms im Aluminiumhydroxyd wieder.

Mit der Wirkung der Zucker vergleichen wir das Verhalten des Invertin-Tonerde-Adsorbates gegen 1 proz. Lösungen von Mannit und Glycerin. Nach 1/2 Stunde war keine nachweisbare Saccharasemenge in Lösung. Zusatz von n/100 Essigsäure änderte daran nichts.

Versuch mit Eiweiß.

Ohne irgendwelche Wirkung war die 2stündige Einwirkung von 0.5proz. Eieralbuminlösung; erst nach 25stündiger Elutionsdauer fanden wir in dem nicht ganz klaren Zentrifugat 6% des Invertins. MICHAELIS schreibt die von ihm beobachtete Ablösung des Invertins durch Serum dem Serumeiweiß zu. Es ist indessen nicht beachtet, inwieweit allein der Gehalt des verwendeten Serums an alkalisch reagierenden Salzen und besonders sein Phosphatgehalt für diesen Effekt verantwortlich ist.

[64] Elution durch primäres Phosphat allein und mit Glycerin.

Das von uns benützte Adsorbat gab einen Teil der Saccharase an primäres Phosphat ab. Die unterste Kurve der Abb. 1 stellt den zeitlichen Verlauf dieses Vorganges dar. Die Elution verläuft anfangs rasch, wird nach einiger Zeit langsamer und dann gehen in gleichen Zeiten gleiche Mengen des Enzyms in Lösung. Wenn man kleine Mengen (1% bis 1‰) Rohrzucker, der ja, wie gezeigt wurde, in dieser Konzentration nicht mehr eluierend wirkt, dem primären Phosphat zusetzt, so ist die nach gewissen Zeiten in Lösung befindliche Enzymmenge nach den Bestimmungen 1 und 2 der Tab. 2 genau so groß wie ohne Zusatz des Kohlehydrats. Aus derselben Tabelle geht hervor, daß auch kleine Mengen von Raffinose sowie Zusätze von Glucose, Maltose und Lactose ohne Einfluß sind. Dagegen wurde durch Mannit und Glycerin die Phosphatwirkung aufs 1 1/2fache gesteigert.

Tabelle 2.

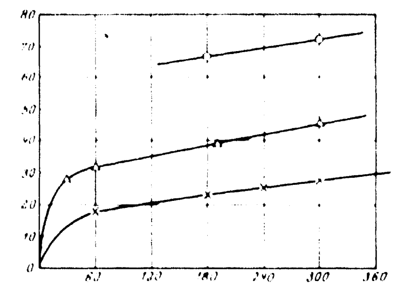
25 ccm Tonerdeadsorbat + Elutionsmittel auf 100; Bestimmung der abgelösten Invertinmengen mit 25 ccm Zentrifugat. Die in der letzten Kolumne angeführten Werte (ber.) sind der Abb. 1 entnommen und entsprechen der Wirkung des primären Phosphates allein nach den in der dritten Kolumne angeführten Elutionsdauern; (18 °C?)

Nr.	Zusatz zu 1 g NaH_2PO_4	Elutionsdauer Minuten	Versuchszeit Minuten	Drehung	Nulldrehungszeit Minuten	Nulldrehungszeit für 25 ccm des ursprüngl. Adsorbates Minuten	Eluiertes Enzym % gefunden	Eluiertes Enzym % berechnet
1	0.1 g Rohrzucker	300	164	14.25?	1330?	97?	29?	[illegible]
2	1 g Rohrzucker	280	131	14.50?	1350?	92?	27.5	27
3	1 g Raffinose	300	216?	13.12	1330?	92?	27.5	27.5?
4	1 g Glucose	240	136?	13.12	1350?	97	25?	25?
5	1 g Maltose	270	202	12.30?	[illegible]	70.5?	27?	26
6	1 g Lactose	300	183	13.58?	1220?	46.5?	28.5?	27.5
7	0.1 g Mannit	300	164	12.65	675?	46.5	40.5?	27.5
8	0.1 g Glycerin	270	151	12.65?	646?	46.5?	43	26

Die in Tab. 3 mitgeteilten Elutionsversuche mit Glycerin-Phosphat zeigen die Abhängigkeit dieses Vorganges von [65] der Zeit und lassen den Einfluß der Temperatur deutlich erkennen. Die bei 30° abgelösten Enzymmengen verhielten sich zu den bei 15,5° beobachteten wie 5:3. Hierin liegt ein wesentlicher Gegensatz zur Elutionswirkung der schwachen Alkalien, die sich weder durch längere Einwirkungsdauer noch durch Änderung der Temperatur steigern ließ.

Tabelle 3.

Nr.	Eluens	Elutionsdauer Minuten	ccm Elution mit [illegible] ccm	Versuchszeit Minuten	Drehung	Nulldrehungszeit Minuten	Nulldrehungszeit bei 100 proz. Ablösung	Eluiertes Enzym %
1	1% NaH_2PO_4, 15,5°	60	10	211	16,75	5640	1030	(18)
		180	25	207	13,86	1500	346	23
		240	25	196	13,70	1400	346	25
		300	25	196	14,17	1540	424	27,5
2	1% NaH_2PO_4 + 1°/₀₀ Glycerin, 15,5°	30	25	122	8,37	305	85	28
		60	25	121	7,48	270	85	31,5
		200	25	104,5	6,72	215	85	36,5
		300	25	117,5	4,10	187	85	45,5
3	1% NaH_2PO_4 + 1°/₀₀ Glycerin, 30,0°	180	25	118	1,05	102	68	66,5
		300	25	80,5	1,40	95	68	72



Abszissen: Elutionsdauer in Minuten.
Ordinaten: Menge abgelösten Enzyms in Prozenten.
Elutionsmittel: × 1% NaH_2PO_4 (15,5°).
△ 1% NaH_2PO_4 + 1°/₀₀ Glycerin (15,5°).
○ 1% NaH_2PO_4 + 1°/₀₀ Glycerin (30°).

[66] Zum Unterschied von Rohrzucker und Maltose, die erst in bedeutender Konzentration die Wirkung des Mononatriumphosphates verstärken, erweisen sich schon minimale Mengen von Glycerin als wirksam. Tabelle 4 zeigt, daß bei immer kleinerer sorgfältiger Dosierung des dreiwertigen Alkohols der Effekt erst bei einer Konzentration von 10^{-6}% nicht mehr meßbar war. Die in Lösung gegangene Enzymmenge war dann so groß, wie es dem Elutionsvermögen des NaH_2PO_4 allein entsprach.

Tabelle [illegible].
(Nulldrehungszeit bei vollkommener Ablösung 254 Minuten; [illegible])

Nr.	Eluens 1 % NaH_2PO_4	[illegible] Minuten	[illegible] Minuten	[illegible]	[illegible]	[illegible] Minuten	Eluiertes Enzym [illegible]	
							[illegible]	[illegible]
[illegible]	2,5% Glycerin	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]		[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Leider konnten wir diese Erscheinung nicht mehr näher verfolgen. Aus demselben Hefeauszug, der inzwischen 4 Monate gestanden hatte, erhielten wir trotz unveränderter enzymatischer Wirksamkeit unter genau denselben Bedingungen wie früher ein Aluminiumhydroxydadsorbat, das nach 4 Stunden erst 18% des Invertins an 1proz. NaH_2PO_4-Lösung abgegeben hatte. Zahlreiche Messungen ließen keinen Einfluß von Glycerin in Konzentrationen von 10 [illegible] bis 10 [illegible]% erkennen. Die bei 15,5° nach 240 Minuten abgelösten Mengen der Saccharase schwankten zwischen 17 und 18%.

Zeitschrift für physiologische Chemie **123**, S. 1 [1922].

48. ZUR KENNTNIS DES INVERTINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER, JOHANNA GRASER und RICHARD KUHN.

Dritte Abhandlung[1].

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 2 Abbildungen.

(Der Redaktion zugegangen am 8. Mai 1922.)

Inhaltsübersicht.

[1] I. und II. Abhandlung: R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21] und Bd. 427, S. 111 [1921/22].

Einleitung.

Unter den bis vor kurzem beschriebenen Invertinpräparaten, die in einer kritischen Übersicht von H. v. EULER und O. SVANBERG[1] und in einer kurzen Einleitung von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[2] besprochen wurden, sind am genauesten untersucht diejenigen von EULER und SVANBERG, die durch fraktionierte Autolyse der Hefe, Fällung des Autolysensaftes durch Alkohol und fraktioniertes Umfällen mit Alkohol gewonnen waren.

Der Zeitwert des besten von diesen Präparaten, die den wichtigen Angaben über Molekulargewicht, Gehalt an Kohlehydraten, Stickstoff und Phosphor und über Vergiftungserscheinungen zugrunde lagen, beträgt 3,6; da indessen die Rohrzuckerspaltung bei 18°, statt unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition von O'SULLIVAN und TOMPSON und v. EULER, 15,5°, gemessen wurde, ergibt die Umrechnung dafür den Zeitwert 4,5. Das Invertin von EULER und SVANBERG enthält Hefegummi, so daß es bei der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure gegen 90% Monose und darüber liefert.

[3] Noch etwas höher scheint die enzymatische Konzentration gewesen zu sein, die C. S. HUDSONS[3]) Invertinlösungen erreicht haben. Sie wurden aus Hefesäften der raschen Autolyse nur durch Ausfällen der Eiweißstoffe mit Bleiacetat und Dialyse gewonnen. Die ungefähren Angaben erlauben die Berechnung eines Zeitwertes von 3 oder eher von 3,5 für die Hudsonschen Lösungen.

Die Isolierung des Invertins durch Adsorptionsmethoden, und zwar unter Anwendung von Aluminiumhydroxyd und Kaolin durch aufeinanderfolgende Adsorption und Elution führte in der 1. Abhandlung von WILLSTÄTTER und RACKE zu Präparaten von höherem Reinheitsgrad. Sie enthielten weder eine Beimischung von Kohlehydrat noch gebundenen Zucker. In festem Zustand dargestellt, besaßen sie beim Wiederauflösen Zeitwerte von 0,67 bis 0,86, Invertinlösungen erreichten den Zeitwert 0,55 bis 0,50. Die in der 2. Abhandlung von WILLSTÄTTER und RACKE aus reineren Autolysaten, nämlich durch fraktionierten enzymatischen Abbau der Hefe, gewonnenen Präparate boten keinen Fortschritt in bezug auf den enzymatischen Reinheitsgrad. Etwas reiner als die früheren waren sie aber insofern, als sie nicht die mindeste Reaktion von Eiweiß und seinen Abbauprodukten zeigten.

Während WILLSTÄTTER und RACKE nur wenige analytische Daten zur Kennzeichnung der erreichten Reinheitsstufe anführten, veröffentlichten vor kurzem H. v. EULER und O. SVANBERG[4]) Angaben über den Phosphorgehalt gereinigter Saccharaselösungen. Sie führten denselben im Zusammenhang mit ihren Beobachtungen über die Vergiftung des Enzyms auf Nucleinsäuregruppen im Molekül der Saccharase zurück. Der Phosphorgehalt erwies sich nämlich in zwei Beispielen beinahe pro-

[1]) Diese Zs. Bd. 107, S. [illegible] [1919], und zwar S. [illegible].
[2]) Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. [illegible].
[3]) Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 36, S. 1566 [1914]; siehe auch C. S. HUDSON, Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 30, S. 1564 [1908], und C. S. HUDSON und H. S. PAINE, Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 32, S. 774 [1910].
[4]) Diese Zs. Bd. 112, S. 282 [1921].

portional dem Invertierungsvermögen. In Präparaten von den Zeitwerten 6,7 und 9,3 fanden sie 0,16 bis 0,19% Phosphor, [4] was, auf hefegummifreies Invertin umgerechnet, mindestens etwa 1,0 bis 1,2% entsprechen dürfte.

Unsere Untersuchung verwertet zur Isolierung des Invertins seine Fällung durch Bleiacetat. Während man bisher mit diesem Reagens die Invertinlösungen aus Hefe von Fremdstoffen befreit hat, beobachteten wir, daß das Invertin aus den Autolysaten nach ihrem Altern vollständig durch Bleiacetat niedergeschlagen wird. Die Wiederholung der Adsorption von Invertin durch die Bleiacetatfällung, am besten mit der Reinigung durch Aluminiumhydroxyd kombiniert, führt zu Invertinlösungen vom Zeitwert 0,35 bis 0,2. Während die Steigerung des Reinheitsgrades bis zur Elution aus der zweiten Bleifällung Erfolg hatte, vermochten viele weitere Anwendungen der Adsorptionsmethoden, Fraktionierungen mit Bleiacetat oder Bleiessig und wiederholte Überführung in Tonerdeadsorbat die Enzymkonzentration nur noch wenig zu erhöhen, entsprechend einer Verbesserung des Zeitwertes bis 0,20, dem günstigsten bisher beobachteten Reinheitsgrad. Die Leistungsfähigkeit unserer Methoden scheint hier aus zwei Gründen ihre Grenze zu erreichen. Ungefähr vom Zeitwert 0,3 an ist die Beständigkeit des Invertins vermindert, unregelmäßig, unzuverlässig, und die Aufgabe, Stabilisatoren für das Enzym zu finden, ist zwar in Angriff genommen, aber noch nicht genügend gefördert. Ferner machen sich bei diesem Reinheitsgrad schon die Beimischungen, die infolge der Unvollkommenheit unserer Apparate und Reagentien in die Lösungen hineingetragen werden, so störend geltend, daß sie die durch vervollkommnete Anwendung der Adsorptionsmethoden erzielten Fortschritte kompensieren. Hauptsächlich dürften die Mängel der Dialysatoren unseren Präparaten geschadet haben. Künftige Fortschritte werden von der Verfeinerung der Arbeitsmittel abhängen.

In der vorliegenden Untersuchung war nicht so sehr die Steigerung der Enzymkonzentration über den Zeitwert von etwa $^1/_4$ Minute hinaus angestrebt, als vielmehr die Fraktionierung nach dem Phosphorgehalt mit Hilfe von Bleiacetat. Die reineren Invertinlösungen, z. B. vom Zeitwert 0,35, wurden von [5] Bleiacetat nur noch teilweise gefällt. Der Phosphor geht zum großen Teil in die Fällung, die Restlösung enthält das Invertin sehr phosphorarm. Außerdem gelingt es, mit geeigneten Eluentien das Invertin aus der Fällung wieder frei zu machen, ohne daß es mehr wie einen kleinen Teil des Phosphors mitnimmt. So wurden bei der Fraktionierung in den Beispielen der Tab. 7 und 8 die Präparate n_1, p und l mit den aus der Wirkung der Lösungen und den Trockenrückständen berechneten Zeitwerten 0,50, 0,29, 0,20 und Phosphorgehalten von 0,006%, 0,02 und 0,027% erzielt.

Von einem gewissen Reinheitsgrad des Enzyms an führt es also weiter, wenn die präparative Methode auch von der Bestimmung akzessorischer Eigenschaften statt allein durch die Messung der Enzymwirkung geleitet wird, von solchen Eigenschaften, die nicht sicher dem Enzym zugehören, sondern möglicherweise seinen Begleitern. Wenn man Peroxydase nach dem Eisen-, Invertin nach dem Stickstoffgehalt zu

fraktionieren versucht, so wird der Vergleich der Enzymfraktionen wesentliche Unterschiede in den Eigenschaften und in der Reinheit auch bei ungefähr gleichem enzymatischem Reinheitsgrad ergeben. Für die enzymatische Reinheit ist es ohne Belang, ob ein bestimmtes Enzym von mehreren anderen, ihm nahe verwandten Enzymen begleitet wird und ob ihm zerstörte Enzymsubstanz beigemischt ist oder aber, ob es sich in einer durch die Hefeauflösung zufällig zusammengewürfelten Gesellschaft von Begleitstoffen befindet. Im ersten Falle wird es sich aber für die chemische Untersuchung stofflich reiner darbieten.

In den erwähnten Invertinpräparaten liegt, wenn man von den noch anhaftenden fremdartigen Stoffen absieht, ein Gemisch der Saccharase vor mit einer Anzahl anderer, zusammengesetzte Zucker und α-Alkylglucoside spaltender Enzyme und mit ihren Zersetzungsprodukten, vielleicht auch ihren Vorstufen. Es ist noch nicht sicher erkannt, wie weit die Adsorptionsmittel unserer Methoden zwischen den aktiven Enzymen einerseits, ihren Vorstufen und ihren Zersetzungsprodukten andererseits zu wählen vermögen. Wahrscheinlich [6] sind die in den Kolloideigenschaften dem Enzym nächst verwandten, durch das Fehlen der aktiven spezifischen Gruppe von ihm sich unterscheidenden Umwandlungsprodukte die hartnäckigsten Begleiter. Im Invertinpräparat vom Zeitwert 0,2 kann nur ein kleiner Bruchteil auf Saccharase selbst treffen.

A. Grundlagen für die Isolierung des Invertins durch Bleifällung.

1. Verhalten der Hefeauszüge gegen Bleiacetat.

Die durch Autolyse der Hefe nach verschiedenen Verfahren gewonnenen Invertinlösungen liefern mit Bleiacetat Niederschläge der Eiweißkörper. Auf diese Weise haben H. v. EULER und S. KULLBERG[1], welche „die Kombination der Enteiweißung mit Bleiacetat und Kaolin" vorteilhaft fanden, und C. S. HUDSON[2] die Invertinlösungen gereinigt. Auch WILLSTÄTTER und RACKE[3] machten von der Vorreinigung der Hefeauszüge mit Bleiacetat öfters Anwendung und beobachteten, daß die Lösungen dabei im allgemeinen kein, manchmal aber etwas Invertin einbüßen.

Das Invertin der Hefeauszüge wird also durch Bleizucker nicht niedergeschlagen. Auch reines Invertin läßt sich durch Bleiacetat nicht fällen. Allerdings gaben die aus Tonerdeadsorbaten isolierten Invertinpräparate[4] noch Fällungen mit Bleiessig und auch mit Bleizucker; da aber in einem Versuche die von der Bleifällung abfiltrierte Invertinlösung, die noch 22% des Enzyms enthielt, selbst mit basischem Acetat keine Fällung mehr lieferte, so wurde vermutet, daß die Reaktion nur auf Verunreinigung beruht. In der Tat gab das in der zweiten Arbeit von WILLSTÄTTER und RACKE[5] durch fraktionierte enzymatische Entleerung der Hefe gewonnene Invertin keinen Niederschlag mehr mit den Bleisalzen, und auch [7] Präparate der vorliegenden

[1] Diese Zs. Bd. 73, S. 335, 338 [1911].
[2] Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 36, S. 306 [1914].
[3] Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21] und zwar S. [illegible]. [5] a. a. O. S. [illegible].
[4] Ann. d. Chem. Bd. 427, S. 111 [1921/22] und zwar S. [illegible].

Arbeit, z. B. eines vom Zeitwert 0,65, wurde in 0,5proz. Lösung weder durch Bleiacetat noch durch basisches Acetat gefällt.

Die Konzentration des Enzyms in den Hefeextrakten ist aber eine vielfach geringere. Die in Betracht kommenden Lösungen enthalten 0,010 bis 0,013% Invertin, bezogen auf den Reinheitsgrad jenes hochwertigen Präparates.

Dennoch ist die Fällung des Invertins aus den Hefeextrakten durch Bleiacetat die leitende Methode der vorliegenden Arbeit. Sie beruht auf der Beobachtung, daß das Verhalten der rohen Invertinlösungen von ihrem Alter abhängt, daß zwar in den frischen Autolysenflüssigkeiten das Invertin nicht, in gealterten aber vollständig fällbar ist. Die Begleitstoffe des Enzyms sind für die Fällung durch Bleiacetat verantwortlich, wie sie auch das übrige Verhalten gegen Adsorbentien und in Adsorbaten beeinflussen.

Schon bei der einmaligen Fällung des Invertins bleibt der Hefegummi, dessen Abtrennung zum erstenmal durch aufeinanderfolgende Reinigung mittels der Tonerde- und der Kaolinadsorbate gelungen ist, in seiner ganzen Menge in der Mutterlauge zurück.

Aus dem Bleiniederschlag, der u. a. Phosphorsaure, Proteine und wahrscheinlich auch Nucleinsäure enthält, läßt sich das Invertin durch Elution mit Ammoniak, Soda und Ammonphosphat eluieren. Seine weitere Reinigung kann mit den Adsorptionsverfahren von Willstätter und Racke geschehen, entweder mit Kaolin, von dem es in diesem Zustand schon glatt adsorbiert wird, oder besser mit Tonerde, oder man wendet wiederholte Fällung mit Bleiacetat an. Dabei nimmt mehr und mehr die Menge der bleifällbaren Stoffe ab, mitunter besonders der für die Adsorption des Invertins verantwortlichen. Dann wird erreicht, daß mit den Begleitstoffen nur noch ein Teil des Invertins in den Niederschlag übergeht, während ein großer Teil im Filtrat zurückbleibt. Die Methode der Fällung mit Bleiacetat eignete sich daher besonders zur Fraktionierung des Enzyms. Sie lieferte günstiges Material für die Prüfung des Invertins auf seinen Gehalt an Phosphor.

[8] 2. Änderung des Verhaltens beim Altern.

Die eigentümliche Änderung hinsichtlich der Fällbarkeit des Invertins beobachteten wir an den nach verschiedenen Verfahren der ersten Abhandlung — Nr. 1 und 2 des IX. Kapitels (Abschnitt A) — dargestellten Autolysaten, nämlich erstens an den durch beschleunigte Autolyse bei Gegenwart von Toluol, also in schwach saurem Medium, und zweitens an den durch rasche Autolyse mit Toluol und Neutralisieren mit Ammonphosphat gewonnenen. Die letzteren, am Ende schon schwach sauer reagierend, wurden stets vor dem Abtrennen von den Heferückständen mit Essigsäure angesäuert. Für das Fortschreiten der enzymatischen Abbauvorgänge ist dies von Bedeutung. Während auf geringe Differenzen in der Reaktion des Mediums bei der Autolyse schon weitgehende Unterschiede im Verhalten der Invertinlösungen zurückzuführen waren, stimmten die sauer und die neutral gebildeten, sei es frisch oder gealtert, miteinander

im Verhalten gegen Bleiacetat überein. Der große Unterschied im Phosphatgehalt war hinsichtlich der Fällung des Invertins ohne Belang.

Die nötige Menge Bleiacetat bis zum Auftreten einer Spur von Blei im Filtrat ermittelten wir in jedem Fall. Während in den jungen Autolysaten der mit dem gesamten Fällungsmittel entstehende Niederschlag nur einen Teil, z. B. [illegible], vom Invertin aufnahm, verschwand aus den gealterten mit dem Bleiniederschlag die ganze Menge des Invertins. Alterung von 2 bis 4 Wochen genügte zwar, um das Invertin fällbar zu machen, günstiger war aber, wie die Tab. 1 zeigt, Alterung von einigen Monaten, weil dann schon mit [illegible] der zur vollständigen Bleifällung nötigen Menge Bleiacetat mehr als 90% des Invertins niedergeschlagen werden.

Die auffallendste, wenn auch nicht die einzige Veränderung, welche die stets mit Toluol versetzten Hefeauszüge namentlich bei saurer Reaktion während des Alterns erleiden, ist die enzymatische Hydrolyse der Eiweißkörper. Die Menge der Peptide nimmt ab, die einfachen Aminosäuren nehmen zu, sie krystallisieren allmählich reichlich aus. Diese Proteolyse [9] läßt sich mit der alkalimetrischen Bestimmung von WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ[1] verfolgen. Nebenher erfolgt Abtrennung von Phosphorsäure aus organischer Bindung und Entbindung von Schwefelwasserstoff.

Tabelle 1. Zunahme der Fällbarkeit des Invertins mit dem Altern.

Nr.	Invertinlösung aus	Alter	Bleiacetat in % der zur [illegible] Niederschlagsfällung erforderlichen Menge	Gefällt Invertin in %
1	Autolyse in saurem Medium (30. April 1921)	[illegible] Tage	100	[illegible]
		14	100	[illegible]
2	Ebenso (31. Mai 1921)	[illegible]	100	[illegible]
		10	100	[illegible]
		14	100	[illegible]
3	Ebenso (1 Teil Hefe, 2 Teile Wasser) Juli 1920	[illegible] Mon.	100	[illegible]
		[illegible]	[illegible]	[illegible]
4	Autolyse mit Ammonphosphat (1 Teil Hefe, 2 Teile Wasser) 25. April 1921	[illegible] Tage	[illegible]	[illegible]
		[illegible]	100	[illegible]
		[illegible]	100	[illegible]
		[illegible]	[illegible]	[illegible]
		[illegible]	[illegible]	[illegible]
5	Ebenso (1 Teil Hefe, 2 Teile Wasser) 6. Nov. 1920	[illegible]	100	[illegible]
		[illegible]	[illegible]	[illegible]
6	Ebenso	[illegible]	100	100
		[illegible]	[illegible]	[illegible]

3. Einflüsse der Begleitstoffe.

Die Fällung des Invertins durch Bleiacetat kann durch Phosphorsäure begünstigt und sogar durch Phosphat allein herbeigeführt werden. Dies gilt besonders für Invertin in reinerem Zustand.

[1] Chem. Ber. Bd. 54, S. 2988 (1921).

[10] Wir vermischten z. B. ein mit Hilfe von Tonerde und Kaolin gereinigtes Invertinpräparat vom Zeitwert 1,5 (30 mg in 20 ccm), das mit Bleiacetat nicht fällbar war, mit Ammoniumphosphat (0,1 g) in der Menge wie in Hefeauszügen und fällten mit Bleiacetat unter Vermeidung eines Überschusses. Das Invertin war sodann vollständig im Niederschlag enthalten, und das Bleiphosphat war nicht durch Ammoniak eluierbar.

Das Bleiphosphat vermag also ähnlich wie nach Willstätter und Racke[1] Calciumphosphat das Enzym zu adsorbieren. Dennoch ist die Bildung des Bleiphosphats nicht der entscheidende Faktor für die Fällung des Invertins aus den Hefeauszügen. Denn es gibt in den rohen Invertinlösungen Begleitstoffe, die der Adsorption des Invertins durch Bleiphosphat entgegenwirken, namentlich in den bei neutraler Reaktion gebildeten Autolysaten. Obwohl diese das zugefügte Ammoniumphosphat und aus Nucleinsäure abgespaltene Phosphorsäure enthalten, lassen sie ja in frischem Zustand beim Fällen mit Bleiacetat nur einen kleinen Teil des Invertins in den Niederschlag gehen. Andererseits kann man nach dem Altern der Neutralextrakte die Phosphorsäure daraus mit Magnesiamischung ausfällen und phosphorsäurefreie Filtrate gewinnen, aus denen mit Bleiacetat das Invertin doch glatt mitgefällt wird.

Ein 80 Tage altes Neutralautolysat (4 l. M.Z.Q. 18) befreiten wir von Phosphorsäure mit Magnesiamischung; der Niederschlag von Ammoniummagnesiumphosphat bewirkte einen Verlust von 7% des Enzyms. Für die Bildung des Bleiniederschlags war dann nur noch $^1/_5$ vom Bleiacetat nötig, das ein phosphathaltiger Hefeauszug braucht, nämlich 50 g. Die Fällung enthielt trotz ihres geringen Quantums 80% vom Invertin (M.Z.Q. 14,0).

Die Begleitstoffe, die in Neutralautolysaten das Invertin deutlich vor der Adsorption wenigstens durch Bleiphosphat schützen, treten in den bei saurer Reaktion gebildeten Hefeauszügen mehr zurück. Aus diesen ist nämlich das Invertin leicht auf Zusatz von Phosphat und Bleiacetat mit dem entstehenden Bleiphosphat zu fällen.

[11] Von einem aus 1 Teil Hefe mit 2 Teilen Wasser unter Toluolzusatz gebildeten Auszug fällten wir sogleich nach dem Abfiltrieren von den Heferesten 100 ccm mit 3,2 g Bleizucker. Im Filtrat blieben 75% vom Invertin. Dann versetzten wir andere 100 ccm mit 2 g Ammonphosphat und mit 8 g Bleizucker. Diesmal blieben vom Invertin nur 25% in Lösung zurück.

Das phosphorsaure Salz kann in diesen Versuchen aber nicht durch phosphorhaltige Neutralautolysate ersetzt werden. Sei es nun, daß sich hier die Phosphorsäure zum beträchtlichen Teil an Kohlehydratmoleküle gekettet hat oder daß die lösend wirkenden Begleiter im Neutralextrakt sich genügend Geltung verschaffen, beim Vermischen der durch saure und durch neutrale Autolyse gebildeten jungen Hefeauszüge und Versetzen mit Bleiacetat fällt das Invertin nicht aus, auch nicht der in den ersteren enthaltene Anteil.

Je 100 ccm der nach den beiden Verfahren gewonnenen frischen Autolysate (M.Z.Q. 0,50 und 0,53) wurden vermischt und zusammen mit 10 g Bleiacetat vollständig gefällt. Das Filtrat (M.Z.Q. 0,800) enthielt dann noch 78% vom ursprünglichen Invertin.

Die als „Altern" bezeichneten Veränderungen der Autolysensäfte beruhen wahrscheinlich auf enzymatischen Vorgängen und bestehen im hydrolytischen Abbau von Inhaltsstoffen der Hefe. Das wechselnde Verhalten des Invertins gegenüber der Bleifällung kann man versuchen, darauf zurückzuführen, daß gewisse durch Blei nicht

[1] a. a. O. S. 84.

oder nicht vollständig fällbare Stoffe, die das Invertin in Lösung zu halten vermögen, aus den Hefeauszügen beim Altern verschwinden. Oder man hat anzunehmen, daß im Gegenteil durch die enzymatischen Abbauvorgänge gewisse Verbindungen erst gebildet werden, die durch Blei fällbar sind und die dabei das Invertin spezifisch adsorbieren. Es dürfte sich aber kaum um einen einzigen Bestandteil der Autolysenflüssigkeiten handeln, der durch sein Verschwinden aus der Lösung oder durch seine Bildung in derselben die zunehmende Fällbarkeit des Invertins bedingt.

Zu den durch Bleiacetat nicht fällbaren Bestandteilen der Hefeauszüge gehören Aminosäuren, einfachere Peptide und Hefegummi. Der letztere hält allerdings keineswegs das Invertin in Lösung. Auch die gealterten Extrakte enthalten den Gummi [12] reichlich, und er bleibt in seiner ganzen Menge ohne Invertin im Filtrat vom Bleiniederschlag. Auch Aminosäuren und Peptide vermögen nicht die Fällung des Invertins zu hindern. Weder läßt sich Invertin, ein unvollkommen gereinigtes Präparat, das noch mit Bleiacetat gefällt wird, durch diese Verbindungen in Lösung halten, noch bewirken Aminosäuren oder ein Dipeptid, beispielsweise zu einem Gemisch von Nucleinsäure mit Invertin hinzugefügt, daß die Nucleinsäure mit Blei ausfällt, ohne Invertin zu adsorbieren. Hingegen sind Proteine, z. B. Albumin, obwohl es durch Bleiacetat reichlich gefällt wird, wohl imstande, die Ausfällung des Invertins durch Bleiacetat wenigstens teilweise zu verhindern.

Ein Invertinpräparat vom Zeitwert [illegible], das mit Bleiacetat einen so starken Niederschlag gab, daß kein Invertin in Lösung zurückblieb, versetzten wir mit [illegible] und [illegible]% eines Gewichtes an Albumin und fällten dann die Lösung mit Bleiacetat. Die Filtrate enthielten noch [illegible] und 43% vom angewandten Enzym.

Mit einem derartigen Einfluß von albuminartigem Protein, dessen Vorkommen im Hefeautolysat P. THOMAS[1] beschrieben hat, scheint in Einklang zu stehen, daß beim Erwärmen der frischen Hefeauszüge auf 60° Eiweißkoagulation erfolgt, und daß sich dann im Filtrate das Invertin ähnlich wie sonst nach dem Altern reichlicher durch Bleiacetat fällen läßt. Die gealterten Autolysate erleiden die Gerinnung in der Wärme nicht mehr. Während z. B. ein Neutralextrakt nur 15 bis 16% vom Invertin an die Bleifällung abgab, stieg der fällbare Anteil nach dem Koagulieren in der Wärme und Filtrieren auf 38%, bei einem anderen, durch saure Autolyse gewonnenen Hefeauszug von 45 auf 73% der im Filtrat vom koagulierten Eiweiß noch vorhandenen Enzymmenge. Betrachtet man aber nicht die verhältnismäßigen, sondern die wirklichen Invertinmengen, die nach der Koagulation oder ohne dieselbe gefällt werden, so sind allerdings die Differenzen recht gering.

Die folgenden Beobachtungen machen die Erklärung wahrscheinlicher, daß beim fortschreitenden Abbau der in den [13] Autolysensäften enthaltenen komplizierten Verbindungen erst die für die Fällung des Invertins verantwortlichen Stoffe in genügenden Mengen entstehen. Man kann nämlich Hefeauszüge frisch mit Bleiacetat fällen, noch ohne erheblichen Verlust von Invertin, und nach dieser Beseitigung

[1] C. R. Bd. 156, I, S. 2024 (1913).

einer größen Menge hochmolekularer Stoffe das Altern verfolgen. Nach einiger Zeit enthalten die Lösungen zwar wieder Verbindungen, die sich durch Bleiacetat fällen lassen, allein das Invertin wird nicht vom Niederschlag aufgenommen. Daraus ist zu schließen, daß der erste Bleiniederschlag gewisse Produkte entfernt hat, deren langsame Hydrolyse beim Altern ebenfalls durch Bleiacetat fällbare, dabei aber Invertin spezifisch adsorbierende Substanzen zu bilden vermag.

Wenn man dieses Verhalten der Hefeautolysate, um die Veränderung beim Altern anschaulich zu machen, auf bestimmte einzelne Stoffe zurückzuführen sucht, so läßt es sich am besten durch den Vergleich mit Nucleoproteinen und Nucleinsäuren erklären.

Sowohl Hefenuclein wie Nucleinsäure wird durch Bleiacetat gefällt. Die Niederschläge unterscheiden sich aber durch ihr Adsorptionsvermögen: bei der Fällung des Nucleins blieb das Invertin (ein durch Bleiacetat nicht fällbares Präparat vom Zeitwert 1,5) in der Lösung, während die Nucleinsäure (50% des Gewichtes vom Invertinpräparat) bei der Ausfällung das Invertin aufnahm. In den Hefeautolysaten wird die Menge der Nucleinsäure durch langsam fortschreitende Abspaltung aus Nucleoproteinen anwachsen. Die zunehmende Fällbarkeit des Invertins kann dadurch erklärt werden, wenn sie auch nicht darauf allein beruhen mag.

4. Verhalten von Gemischen frischer und gealterter Hefeauszüge.

Sei es nun, daß die Hefeautolysate erst in gealtertem Zustand durch Bleiacetat fällbare, Invertin adsorbierende Substanzen aufweisen, oder daß sie, frisch bereitet, solche Verbindungen enthalten, welche die Adsorption des Invertins durch die Bleifällung verhindern, jedenfalls ist das Invertin in seinem [14] Verhalten von den Begleitstoffen wesentlich abhängig. Das zeigt sich auch bei der Untersuchung, wie sich Gemische von frischen und gealterten Hefeauszügen hinsichtlich der Fällung des Invertins verhalten, wie weit sie sich gegenseitig darin zu beeinflussen vermögen.

Aus der folgenden Zusammenstellung (Tab. 2) ergibt sich, daß weder das Invertin der jungen Hefeextrakte in dem Gemische mitgefällt, noch das Invertin der gealterten durch die unversehrten Begleitstoffe der frischen Autolysate vor der Fällung geschützt wird. Das frische und das gealterte Autolysat, jedes einzelne behält sein eigentümliches Verhalten auch in den Gemischen bei.

Tabelle 2.
Bleifällung des Invertins aus Gemischen frischer und gealterter Autolysate.

Invertinlösungen	Invertingehalt (M.Z.Q.)		Menge des Bleiacetats		Invertingehalt (M.Z.Q.) des Filtrats von der Bleifällung
	frisch	gealtert	erforderlich zur Fällung	angewandt	
Neutralautolysat, vom 6. XI. 20, gealtert, 100 ccm		0,48	5 g	3 g	0,014
Neutralautolysat, vom 12. VII. 21, frisch, 100 ccm	0,50	·	7 g	7 g	0,445
100 ccm frisch + 100 ccm gealtert	0,50	0,48	12 g	10 g	0,414
100 ccm frisch + 200 ccm gealtert	0,50	0,96	17 g	13 g	0,470
200 ccm frisch + 100 ccm gealtert	1,00	0,48	10 g	17 g	0,788

Man erkennt, daß in diesen Flüssigkeiten das Invertin nicht so wie in seinen reinen Lösungen enthalten ist, nicht frei und bereit, Assoziationen mit gelösten hochmolekularen Stoffen mit großer Geschwindigkeit einzugehen, sondern eher in Konglomerate von spezifischem Verhalten eingehüllt. Wenn [15] die Fällung des Invertins aus solchen Autolysaten z. B. durch einen Stoff wie nucleinsaures Blei bewirkt wird, so handelt es sich nicht einfach um einen Adsorptionsvorgang in einem binären System.

5. Elution des Invertins aus den Bleifällungen

In den durch Bleiacetat bewirkten Fällungen läßt sich das Enzym zum Unterschied von seinen Tonerde- und Kaolinadsorbaten nicht quantitativ bestimmen, man findet nur beispielsweise 10 bis 17% des wirklichen Invertingehalts. Auch in den Lösungen von reinerem Invertin, die mit Bleiacetat nicht mehr gefällt werden, setzt schon eine geringe Menge Bleiacetat die enzymatische Wirkung herab, die sich bei der Dialyse wieder erholt[1].

Aus seinen Adsorbaten in Aluminiumhydroxyd und Kaolin ließ sich das Enzym durch eine Anzahl chemischer Mittel freilegen[2], z. B. manchmal durch sehr verdünntes Ammoniak und Natriumcarbonat, stets mit Alkali- und Ammonphosphat. Die Bleifällungen werden im allgemeinen von denselben Mitteln eluiert, so daß sie für die Isolierung des Enzyms, für seine Trennung von vielen Begleitstoffen vorteilhaft angewandt werden können. Da die Freilegung des Invertins aus diesen Niederschlägen nicht nur für die präparativen Methoden Bedeutung hat, da sie auch für die Theorie der Enzymadsorbate Bemerkenswertes bietet, ist es angezeigt, auf die Beobachtungen genauer einzugehen. Es zeigt sich bei den Elutionen der Bleiniederschläge noch mehr wie bei ihrer Ausfällung, daß bei diesen Erscheinungen das Invertin nicht als ein bestimmter Stoff wirkt, sondern daß es verschiedenartige Invertin enthaltende Systeme gibt, Gesellschaften, die das Invertin mit seinen wechselnden und veränderlichen Begleitstoffen bildet. Unter den mit dem Invertin vergesellschafteten nicht enzymatischen Begleitstoffen [16] kommen auch entschieden elektropositive oder elektronegative Körper vor, welche die Affinitäten des Enzymkomplexes nach wechselnden Richtungen zu orientieren vermögen.

Zwischen Tonerdeadsorbaten und den Bleifällungen bestehen wesentliche Unterschiede. Das Verhalten gegen Rohrzucker ist z. B. verschieden. Die Wirkung des Rohrzuckers auf Invertin, das mit Eisenhydroxyd niedergeschlagen war, hat O. MEYERHOF[3]) zuerst untersucht und er hat die Freilegung von 3/4 durch 4proz. Rohrzuckerlösung erzielt. Aus den Tonerdeadsorbaten wird das Enzym durch Rohrzucker plus Mononatriumphosphat quantitativ eluiert[4]). Hingegen ließ sich die invertinhaltige

[1] Vergiftung des Invertins durch Silber- und Quecksilbersalze und Anilin und seine Regeneration durch Dialyse ist von H. v. EULER und O. SVANBERG (Diese Zs. Bd. 114, 137 [1921]) eingehender beschrieben worden.

[2] Erste Abhandlung S. 77 und 87; zweite Abhandlung S. 136.

[3]) Pflügers Arch. Bd. 157, 251 [1914] und zwar S. 271.

[4]) Abhandlung I, S. 18 u. 71; Abhandlung II, S. 126; ferner R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 116, S. 53 [1921].

Bleifällung von Rohrzucker allein oder von Rohrzucker plus primärem Phosphat gar nicht zerlegen, ebensowenig von Glycerin plus primärem Phosphat.

Von einem durch rasche Autolyse mit Toluol gewonnenen Hefeauszug wurden 250 ccm mit 5 g Ammonphosphat versetzt und mit 20 g Bleizucker gefällt. Der Niederschlag enthielt 84% vom Invertin; beim Eluieren mit 250 ccm 5proz. Rohrzuckerlösung gab er keine Spur von Enzym ab.

Von dem nämlichen Autolysat wurden weitere 250 ccm gefällt und der Niederschlag mit 250 ccm 1proz. Mononatriumphosphat, enthaltend 5% Rohrzucker, behandelt. Nach raschem Abtrennen mit der Zentrifuge war die Rohrzuckerlösung nicht merklich gespalten und enthielt kein Invertin.

Das Verhalten der Tonerdeadsorbate war vom Reinheitsgrad des Invertins wesentlich abhängig. Die ersten Aluminiumhydroxydadsorbate im Gang des Verfahrens von WILLSTÄTTER und RACKE gaben das mit elektronegativen Begleitern assoziierte Invertin bei der leichtesten Alkalisierung der Tonerde glatt ab. War aber das Invertin reiner, wie die durch fraktionierten Abbau der Hefe gewonnenen, darauf schon einmal mit Tonerde und Kaolin gereinigten Präparate[1], die aufs neue mit Aluminiumhydroxyd adsorbiert wurden, dann erschien es mitsamt den noch anhaftenden Begleitstoffen in schon elektrisch mehr ausgeglichenem Zustand, annähernd neutral. Dann war [17] statt der einfachen Alkalisierung eine mehr spezifische Elution durch alkalisches Phosphat erforderlich. Möglicherweise spielte aber auch schon Phosphatbildung aus beigemischter Phosphorsäure eine Rolle bei der Zerlegung des ersten Tonerdeadsorbates durch Ammoniak.

Die Invertin enthaltenden Bleifällungen geben das Enzym in Reaktionen frei, die einen wesentlichen chemischen Umsatz erfordern, z. B. die Umwandlung in Bleiphosphat. Die voluminösen, flockigen Niederschläge ändern sich in ihrer ganzen Masse, sie setzen sich schwer und dicht zu Boden. Aber auch hier kommt es vor, daß schon die einfache schwache Alkalisierung genügt, um aus der Fällung das Invertin freizulegen. Freilich kann auch dabei Alkaliphosphat auftreten, da im Niederschlag Phosphorsäure vorkommt. Sehr verdünntes Ammoniak (0,1%) eluiert in gewissen Fällen, wie die Tab. 3 zeigt, das Invertin aus dem Bleiniederschlag vollständig, in anderen, obwohl die Fällung ganz ähnlich gebildet war, fast gar nicht. Da also das Ammoniak in seiner Wirkung zu sehr vom Reinheitsgrad des adsorbierten Invertins abhängt, ist es als Eluens unzuverlässig. Ein gleichmäßig wirkendes Mittel ist dagegen Ammoniumphosphat, z. B. Diammonsalz mit etwas überschüssigem Ammoniak [$(NH_4)_2HPO_4$ in 0,05- bis 0,1proz. Ammoniak, entsprechend 2,4 bis 2,5 NH_3 auf 1 Molekül H_3PO_4)]. Die Phosphorsäure läßt sich gut durch Arsensäure oder durch Citronensäure ersetzen. Man macht von der Elution durch Arsenat im folgenden präparative Anwendung. Da die Phosphate bei der Dialyse der Invertinlösungen kaum vollständig entfernt werden können, ersetzen wir sie mitunter durch Arsenate, um den aus der Hefe stammenden Phosphor und das aus den Reagentien stammende Arsen analytisch zu unterscheiden.

[1] II. Abhandlung, S. 133 u. 136.

In der Tab. 3 sind aus den Erfahrungen, die mit der präparativen Anwendung der Invertin-Bleifällung gewonnen wurden, einige Beispiele ausgewählt. Es werden die in präparativem Maßstab (Fällungen aus 2 bis 8 l Autolysat, behandelt mit 1 bis 4 l Eluens) und zwar durch zweimalige Elution der Bleifällungen erhaltenen Invertinausbeuten (Proz.) verzeichnet, in einigen Fällen (mit eingeklammerten Zahlen) [18] mit einmaliger Elution erhaltene Enzymausbeuten aus analytischen Versuchen in kleinerem Maßstab (Fällung aus 200 ccm, eluiert mit 100 ccm) oder von den letzten Reinigungsphasen der mehrfach vorbehandelten Invertinlösungen.

Tabelle 3. Elution der Invertin-Bleiadsorbate.

Invertinlösung	[illegible] Ammoniak	[illegible] Natriumacetat	[illegible] phosphat [illegible] NH_3	[illegible] NH_3
Neutralautolysat vom [illegible] XI. [illegible] Monate alt	[illegible]			
Neutralautolysat vom [illegible] XI. [illegible] Monate alt	[illegible]	[illegible]		
Daraus durch Bleifällung, Sodaelution, Tonerdeadsorption, NH_3-Elution gereinigt, wieder mit Bleiacetat gefällt	[illegible]			
Neutralautolysat vom [illegible] VII. [illegible] Monate alt	[illegible]		[illegible]	
Neutralautolysat vom [illegible] VII. [illegible] Monate alt	[illegible]			
Autolyse bei saurer Reaktion, Juli [illegible] Monate alt	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
Autolyse bei saurer Reaktion [illegible] VII. [illegible] Monate alt	[illegible]		[illegible]	[illegible] [illegible]
Aus Neutralautolysat vom [illegible] VII. [illegible] mit Bleifällung, Tonerde, Bleifällung gereinigt, wieder mit Bleiessig gefällt			[illegible]	[illegible]
Aus Neutralautolysat vom [illegible] XI. [illegible] mit Bleifällung, dann Tonerde gereinigt, wieder mit Bleiacetat gefällt	[illegible]		[illegible]	

[19] Die Koadsorbentien und Koeluentien vermögen dem Invertin, das in reinerem Zustand durch Bleiacetat, sogar durch Bleiessig nicht gefällt wird, bei den aufeinander folgenden Adsorptions- und Elutionsvorgängen in die Bleifällung, Tonerde und wieder in den Bleiniederschlag zu folgen. Sie bedingen, daß das Invertin nach der ersten Reinigung mit Bleiacetat noch weiter mit Bleiacetat gefällt werden kann. Wenn die erste Bleifällung sich durch Ammoniak eluieren ließ, pflegte auch die zweite ebenso eluierbar zu sein. Erst nach mehreren Fällungen und Elutionen ist das Verhältnis zwischen Invertin und seinen Begleitstoffen zugunsten des Invertins so verändert, daß nur noch ein Teil des Enzyms niedergeschlagen werden kann. In dieser Enzymfraktion findet dann eine außerordentliche Anreicherung gewisser Begleitstoffe statt, z. B. der gebundenen Phosphor enthaltenden, die durch die systematische Anwendung der Bleifällung und ihrer Elution von einem Teil des Invertins ganz entfernt und mit einem anderen Teil desselben eng vergesellschaftet werden.

Unter den als Koadsorbentien wirkenden Bestandteilen der Bleifällung werden *Proteine, Phosphorsäure und als wahrscheinlich besonders wirksames Koadsorbens Nucleinsäure gefunden.* Die mit Schwefelwasserstoff aus unvollständig eluiertem Bleiniederschlag erhaltene Lösung gibt die üblichen Eiweißreaktionen und starke Reaktion von Molisch, sie liefert mit Kupfersulfat reichliche Fällung.

Die Elution der Bleiniederschläge begegnet nicht selten großen Schwierigkeiten. Manche Hefeauszüge, sogar gealterte, sind für die Methode ungeeignet, nicht für die Fällung mit Bleiacetat, aber für die Elution des Niederschlags. Dies sind besonders gewisse Autolysensäfte, bei deren längerem Stehen — immer bei Gegenwart von Toluol — offenbar infolge abweichenden Verlaufs der Alterungsvorgänge ausnahmsweise kein Schwefelwasserstoff auftrat und die, statt eine hellgelbe oder grünlich hellbraune Farbe anzunehmen, eine dunkelbraune Farbe behielten.

Von einem und demselben Neutralautolysat (vom 30. VII. 21) verhielten sich zwei, erst bei dem langsamen Filtrieren von den [20] Heferückständen getrennte Anteile beim Altern verschieden. Ein Teil des Autolysats lieferte schon nach 2½ Monaten Bleifällungen, die in der beschriebenen Weise mit Ausbeuten von 70 bis 83 % eluiert werden konnten (vgl. Tab. 3). Die Bleiniederschläge aus dem anderen Teil desselben Autolysats waren noch nach 4½ Monaten Alterns in verschiedenen Versuchen nur mit Ausbeuten von 3,5, 17,5 und 10,6 eluierbar.

Während eine Alterungsperiode von etwa 4 Wochen schon genügt, um das Invertin der Hefeauszüge durch Bleiacetat fällbar zu machen, übte ein viel weitergehendes Nachaltern in manchen Fällen einen deutlich günstigen Einfluß auf die Eluierbarkeit des Bleiniederschlags aus.

1. Beispiel: Ein Neutralautolysat vom 31. X. 21 wurde 40 Tage alt, mit 75 % der für eine vollständige Bleifällung nötigen Menge Bleizucker versetzt, 200 ccm mit 10 g. Das Invertin war vollständig im Niederschlag. Die Elution durch 100 ccm 0,5 % Ammonphosphat und 0,05 % Ammoniak entzog dem Niederschlag nur 5 % vom Invertin. Nach weiteren 3 Monaten wurde der Versuch genau wiederholt. Dabei ließen sich 51 % eluieren.

2. Beispiel: Von einem Neutralautolysat vom 30. VII. 21 fällten wir nach 4½ Monaten 200 ccm mit 10 g Bleiacetat, d. i. ¾ der zur vollständigen Niederschlagsbildung nötigen Menge. Zur Elution dienten 100 ccm ammoniakalisches Phosphat. Nur 4 % Invertin gingen in Lösung. In anderen Versuchen, mit etwas mehr Eluens und in 2 Elutionen, stieg die Ausbeute auf 17 % vom Invertin der Bleifällung. Eine Nachalterung von weiteren 3 Monaten veränderte dann das Verhalten des Autolysats. Die Elution unter denselben Bedingungen ergab eine Ausbeute von 42 %.

3. Beispiel: Ein durch rasche Autolyse mit Toluol, also bei saurer Reaktion gewonnenes Autolysat vom 16. II. 21 wurde zuerst nach 2½ Monaten geprüft. 200 ccm mit 8 g Bleizucker gefällt, gaben an 0,1 proz. Ammoniak nur 4 % des Invertins ab. Sogar nach 9 Monaten gab das Autolysat nur sehr schlecht eluierbare Bleifällungen. Es wurde mit 8 g, d. i. der zur vollständigen Niederschlagsbildung erforderlichen Menge Bleiacetat für 200 ccm gefällt, und der Niederschlag mit 100 ccm ammoniakalischem Phosphat eluiert. Die Invertinmenge betrug nur 7,6 %. Dann, in weiteren 3 Monaten, änderte sich das Verhalten des Autolysats wesentlich. Die einmalige Elution der Bleifällung aus 200 ccm-Proben mit 100 ccm 0,5 proz. Arsenat plus 0,05 proz. Ammoniak ergab in verschiedenen Versuchen 34 und 51 %, die Verarbeitung in großem Maßstab (Bleifällung aus 6 l Autolysat mit 3 l Arsenat in 2 Elutionen) lieferte eine Ausbeute von 62 % des Invertins.

Eine gewisse Verbesserung der Elution läßt sich öfters dadurch erzielen, daß der Bleiacetatniederschlag mit so wenig [21] wie möglich Fällungsmittel erzeugt wird. Mit beispielsweise 60 % der zur vollständigen Niederschlagsbildung erforderlichen Menge Bleiacetat wurden öfters schon 95 % vom Invertin ausgefällt. Die Elutions-

ausbeute war dann gewöhnlich höher als bei Anwendung der ganzen Bleimenge, die von der Flüssigkeit verbraucht wird.

Z. B. gab das wiederholt erwähnte Neutralautolysat vom 30. VII. 21 bei vollständigem Fällen durch Blei und Eluieren mit Phosphat eine Elutionsausbeute von [illegible] %, beim Fällen mit $^3/_4$ der Bleimenge, wobei 71 % des Invertins niedergeschlagen wurden, [illegible] % des im Niederschlag adsorbierten Invertins.

B. Darstellung und Fraktionierung des Invertins mit Bleiacetat.

1. Hefen und Autolysate.

Die Vorbedingungen für die Isolierung des Invertins waren in dieser wie in den zwei vorangeschickten Arbeiten ungünstiger als anscheinend bei C. S. HUDSON und gewiß ungünstiger als bei H. v. EULER und O. SVANBERG sowie bei J. MEISENHEIMER, ST. GAMBARJAN und L. SEMPER, die über besonders enzymreiche Hefe als Ausgangsmaterial verfügt haben. Sie war durch geeignete Ernährung auf hohen Invertingehalt gezüchtet und zwar nach v. EULER und SVANBERG[1] bis zu Zeitwerten von 100 bis 90. Die Münchener Brauereihefe, deren Invertingehalt in der schlimmen Zeit vom Herbst 1918 bis Februar 1920 in vielen Bestimmungen verfolgt wurde[2], zeigte im Durchschnitt den Zeitwert 341. In den letzten $1^1/_2$ Jahren ergab die besser ernährte Hefe derselben Münchener Brauerei, wie die folgende Zusammenstellung erkennen läßt, in merkwürdiger Übereinstimmung den gleichen Durchschnittsgehalt (Zeitwert 328) an Invertin und ähnliche Schwankungen in demselben, sie gab aber in die Autolysate mehr Extraktstoffe ab und war daher für die Invertingewinnung noch weniger vorteilhaft als die Hefe des Jahres 1919.

[22] Hefen der Löwenbrauerei in München

(Trockengewicht 23 bis 27 %, durchschnittlich 25 %.)

November	1920:	304, 331, 306, 326, 266, 287
Februar	1921:	267, 318
April	1921:	370
Mai	1921:	288, 342, 344
Juni	1921:	326
Juli	1921:	300, 310, 306
Oktober	1921:	358, 317
Dezember	1921:	384
Januar	1922:	266
März	1922:	346

Pschorrbräuhefen, München

Oktober	1921,	niedriggärend A:	[illegible]
"	1921,	Exportbierhefe:	[illegible]

Die invertinreichste Hefe, die wir kennen lernten, war eine dänische Brennereihefe des Handels. Die von WILLSTÄTTER und STEIBELT[3]) in einer Untersuchung über maltasearme Hefen in enzymatischer Beziehung beschriebene Rasse (vom 21. II. 21) hatte den Zeitwert 87. Als wir aber 9 Monate später durch die Gefälligkeit des Herrn

[1] Diese Zs. Bd. 107, S. 269 [1919]. [2] Erste Abhandlung, S. 13.

[3]) Diese Zs. Bd. 115, S. 211, und zwar S. 215 [1921].

Professor A. Jörgensen in Kopenhagen eine größere Menge von dänischer Preßhefe des Handels besorgt bekamen, war dies eine Hefe vom Invertinzeitwert 255. Sie erwies sich als nicht geeignet für die rasche Autolyse nach Hudson. Dabei lieferte sie in 5 Tagen einen Auszug mit nur 32%, in 8 Tagen mit 35% ihres Invertins (ohne Verlust filtriert gedacht). Günstiger verlief die Autolyse nach dem Neutralverfahren mit Ammoniumphosphat. Dabei gingen in 5 Tagen 90% des Invertins in Lösung, deren Zeitwert auf Trockengewicht bezogen 179,5 betrug.

Von den nach zwei Verfahren der raschen Autolyse, bei schwach saurer Reaktion (nach Hudson) und bei neutraler (nach Willstätter und Racke) gewonnenen Hefeauszügen hatten sich leider die letzteren, die schönen, invertinreichen Neutralautolysate für die Invertingewinnung nach den **[23]** Adsorptionsmethoden als ungeeignet erwiesen[1]. Wir gingen nun darauf aus, ein auch auf die Neutralauszüge anwendbares Verfahren auszubilden. Dieser Absicht entspricht die im folgenden beschriebene Isolierung mit Bleiacetat.

Aus der Autolyse mit Toluol bei saurer Reaktion (1 Teil Hefe, 2 Teile Wasser) betrug unsere Invertinausbeute, quantitativ filtriert gedacht, in 5 Tagen z. B. 94 und 97%, aus der Autolyse mit neutraler Reaktion (1 Teil Hefe, 1 Teil Wasser, vor dem Filtrieren mit einem weiteren Teil Wasser verdünnt) z. B. 122, 115, 130%, manchmal auch nur 100, 106, 108% vom Invertin der Hefe.

Der Reinheitsgrad der Autolysate, der aus den Zeitwerten bezogen auf Trockengewicht hervorgeht, war nach dem Neutralverfahren viel ungünstiger als in unserer ersten Arbeit[2]. Während die Hefe damals Neutralauszüge von den Zeitwerten 142 bis 114 geliefert hatte, betrugen in den Versuchen von November 1920 bis Dezember 1921 die Zeitwerte 257, 255, 247. Der Zeitwert eines Autolysats nach Hudson (auf Trockengewicht bezogen) war 180 entsprechend den früheren Zahlen von 160 bis 206. Diese Enzymkonzentrationen stehen den äußerst günstigen Zeitwerten gegenüber, die in der zweiten Arbeit beim fraktionierten enzymatischen Abbau der Hefe erzielt wurden[3], nämlich 78 und 55 und dem Zeitwert 45 (umgerechnet auf 15,5°) des Autolysats von O. Svanberg[4] aus der invertinreich gezüchteten Hefe.

Maße der Invertinwirkung.

Die Angaben beziehen sich auf 15,5° gemäß der Definition des Invertinwertes von C. O'Sullivan und F. W. Tompson und H. v. Euler. Gemessen wurde sehr häufig nicht dieser, sondern der von Willstätter und Steibelt[5] vorgeschlagene **[24]** „Vergleichswert" (Zeit der 50proz. Spaltung, mit 0,5 g, d. i. der zehnfachen Menge Hefe oder Präparat, bei 30°, mit einer Lösung von nur 1,1875 g Rohrzucker in 25 ccm), dessen Bestimmung praktische Vorteile bietet. Sie erfordert viel weniger Enzym als die Bestimmung nach O'Sullivan und Tompson.

[1] Erste Abhandlung, S. 34 u. 40. [2] S. 53 u. 54.
[3] S. 135. [4] Diese Zs. Bd. 100, S. 65, und zwar S. 73 [1920].
[5] Diese Zs. Bd. 111, S. 157 [1920], und zwar S. 160, und Bd. 115, 211 [1921], und zwar S. 214.

Der Zeitwert ergibt sich (vgl. Tab. 4) aus dem Vergleichszeitwert durch Multiplikation mit 106.

Tabelle 4. Vergleich der beiden Maße für Invertin

Nr.	Invertinlösung	[illegible] Minuten	[illegible] Minuten	Faktor
1	Hefeauszug (1 Teil Hefe, 2 Teile Wasser und Toluol), 1¹/₂ Jahre alt	[illegible]	[illegible]	[illegible]
2	Ebenso, 1 Monat alt	[illegible]	[illegible]	106
	Desgl.	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	Präparat aus neutralem Hefeautolysat (Zeitwert [illegible])	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	Desgl.	[illegible]	[illegible]	[illegible]

2. Bindungsvermögen der Bleifallungen.

Um die Mengen von Bleizucker zu vergleichen, die für die Invertinfallungen erforderlich sind, beziehen wir sie auf den Menge-Zeit-Quotienten 1 des Invertins. Der Quotient Bleiacetat : M.Z.Q. 1 gibt an, wieviel Bleiacetat verbraucht wird, um das Invertin so weitgehend zu fällen, als es unter den gegebenen Bedingungen gefällt werden kann. Man erkennt aus der Tab. 5, daß der Quotient weder vom Verfahren der Autolyse noch vom Alter der Hefeauszüge deutlich beeinflußt [25] wird, sondern zunächst von der Beschaffenheit der angewandten Hefen, dann bei reinerem Invertin von der Natur der Begleitstoffe. Gewisse Hefelieferungen gaben Autolysate, die für den Menge-Zeit-Quotienten 1 etwa 11 g, andere, die nur 6 bis 7 g Bleizucker erforderten. Diese niedrigsten Zahlen, die man bei gewissen mit Ammonphosphatzusatz bereiteten Neutralautolysaten beobachtete, drücken Mengen von Bleiacetat aus, die nicht viel größer sind als die allein für die zugefügte Phosphorsäure berechneten; dies waren 5,5 g. Aber gefällt wird nicht Bleiphosphat, sondern viel Proteinbleiphosphat.

Tabelle 5. Verhältnis zwischen Bleiacetat und Invertin

Autolysat			Bleiacetat : M.Z.Q. 1		
Verfahren	Alter (Monate)	M.Z.Q.	im Hefeauszug	nach der ersten Bleireinigung in der Elution von [illegible]: bezogen auf das angewandte Invertin	nach der ersten Bleireinigung in der Elution von [illegible]: bezogen auf den gefällten Anteil
Neutral					
[illegible] XI. 20	[illegible]	109	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible] XI. 20	[illegible]	109	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible] XI. 20	8	[illegible]	[illegible]	0,7	0,7
[illegible] VII. 21	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible] VII. 21	[illegible]	21,6	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible] VII. 21	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,26
22. VII. 21	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,7
[illegible] VII. 21	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,64	0,64
Sauer					
6. VII. 21	[illegible]	172	6,2	[illegible]	0,35
16. II. 21	[illegible]	79	[illegible]	0,24	0,24

Die zweite Fällung von Bleiacetat im Gang des Verfahrens ist, da sie nach dem Überführen in Aluminiumhydroxydadsorbat und Eluieren aus demselben vorgenommen wird, der dritte Adsorptionsvorgang. Natürlich wird dann bedeutend weniger Bleisalz verbraucht, aber doch noch überraschend viel, wie z. B. die Quotienten 1,7 bis 1,9 in [26] der Tab. 5 zeigen. Die Quotienten Bleiacetat : M.Z.Q. 1 gehen hier noch weit auseinander. Es vermag also nicht einfach eine gewisse Bleifällung eine konstante Menge Invertin zu binden, sondern es gibt gut und schlecht adsorbierende Fällungen. Invertin bleibt auch in manchen Beispielen zu einem bedeutenden Bruchteil gelöst zurück, wenn viel Bleiacetat verbraucht wurde. Die Fällung mit dem größten Bindungsvermögen für Invertin wies den Quotienten 0,2 auf.

3. Methode und Präparate.

Die neue Methode der Isolierung des Invertins ermöglicht, aus den gealterten Hefeauszügen schon durch die einmalige Fällung mit Bleiacetat und Elution des Niederschlags das Enzym, wenn auch sein Zeitwert (5 bis 10) noch recht hoch ist, vollständig vom Hefegummi zu trennen, der in der Mutterlauge zurückbleibt. In den Elutionen sind dem Enzym noch reichlich Eiweißkörper beigemischt, die in allen Fällen durch einmalige Reinigung mit Aluminiumhydroxyd zum großen Teil, aber nicht vollständig beseitigt werden. Während für das Verfahren von Willstätter und Racke die Fällung der eingeengten Elution mit Aceton wichtig und sogar nötig war, ist nun das Invertin in der Elution aus Tonerde schon so rein (Zeitwert 3,5 bis 1,5), daß es sich von Aceton nicht mehr fällen läßt. Aus 50 bis 60% Aceton enthaltender Lösung fällt nur invertinarmer Niederschlag aus, zugleich erleidet der Rest des Enzyms in der Mutterlauge Zersetzung. Die Elution wird daher direkt weiter verarbeitet, und zwar zum zweiten Male mit Bleiacetat gefällt. Dabei zeigen sich je nach Darstellungsweise und Alter der Hefeautolysate große Unterschiede. Es kam vor, wie die Zusammenstellung einiger Beispiele in der Tab. 6 zeigt, daß durch Bleiacetat das Invertin zum zweiten Male vollständig oder zum großen Teil oder nur etwa zur Hälfte oder auch nur zu einem geringen Teile gefällt wurde. In solchen Fällen pflegte dann Bleiessig das Enzym vollständig niederzuschlagen.

[27] Tabelle 6. Verhalten des Invertins bei der zweiten Bleifällung.

Nr.	Invertinlösung	2. Fällung durch Bleiacetat	Präparat aus der Fällung	Restlösung	Präparat aus der Restlösung
1	1. Bleifällung durch Arsenat eluiert, Tonerdeadsorbat mit NH_3 eluiert, M.Z.Q. = 30,3	Vollständig. Elution d. Arsen., M.Z.Q. = 27,8	Präparat *q* Zeitw. 0,26	0	
2	1. Bleifällung mit Soda eluiert, Tonerdeadsorb. mit NH_3 eluiert, M.Z.Q. = 6,4	Vollständig. Elution d. NH_3, M.Z.Q. = 4,6	Präparat *i* Zeitw. 1,03 P-Geh. 1,83	0	

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Nr.	Invertinlösung	2. Fällung durch Bleiacetat	Präparat aus der Fällung	Restlösung	Präparat aus der Restlösung
3	1. Bleifällung durch Phosphat eluiert, Tonerdeadsorbat mit NH_3 eluiert. M.Z.Q. = 8,6	[illegible] % Elution durch Phosphat [illegible] % M.Z.Q. [illegible] eingeengt nur [illegible]	Präparat g Zeitw. [illegible] P.Geh. [illegible]	[illegible] % M.Z.Q. [illegible]	Präparat h Zeitw. [illegible] P.Geh. [illegible]
4	Ebenso wie Nr. 3. M.Z.Q. = 7,1	45 %. Elution durch Phosphat M.Z.Q. [illegible]	Präparat i, nach Dialyse Zeitw. [illegible] P.Geh. [illegible] Präparat j, nach Ausfällen der Phosphorsäure und Dialyse Zeitw. [illegible] P.Geh. [illegible]	[illegible] %	
5	Ebenso wie Nr. 2, nur mit NH_3 statt Soda eluiert. M.Z.Q. = 8,1	[illegible] %		[illegible] % M.Z.Q. [illegible]	Präparat [illegible] Zeitw. [illegible]
6	Ebenso wie Nr. 3. M.Z.Q. = 8	[illegible] %		[illegible] % M.Z.Q. [illegible] zum 2. Male mit Bleiacetat gefällt neue Restlösung M.Z.Q. [illegible] nochmals durch Tonerdeadsorption gereinigt, mit Phosphat eluiert M.Z.Q. [illegible]	Präparat a Zeitw. [illegible] P.Geh. [illegible]

[28]

Erste Bleifällung. Ein durch rasche (5tägige) Autolyse von Löwenbräuhefe (13 kg von 25,35% Trockengewicht) mit der doppelten Menge Wasser unter Zusatz von Toluol gewonnener Autolysensaft (6. VII. 21) besaß den Zeitwert 286, bezogen auf Hefe, und 180, bezogen auf Trockengewicht. Von dem 6½ Monate gealterten Hefeauszug fällten wir 26,5 l (M.Z.Q. 172) mit 930 g Bleizucker, das ist 75% der Menge, die in einem Vorversuche mit ¼ l zur vollständigen Niederschlagsbildung benötigt worden. Der Niederschlag enthielt das gesamte Invertin. Er war infolge eines Gehalts an Bleisulfid hellbräunlichgrau, grobflockig und voluminös, schlecht absitzend. Diese Fällung wurde mittels der Zentrifuge abgetrennt und am besten in ihren Bechern unter wiederholtem Anrühren mit destilliertem Wasser gewaschen. Auf 30½ l-Zentrifugengläser [29] verteilt, füllte sie diese zu etwa ⅓. Auch die zweimalige Elution nimmt man am besten in den Zentrifugenbechern vor, in denen sich das Eluens gut mit dem rasch dichter werdenden Bleiniederschlag verreiben läßt. Dafür dienten zweimal 6½ bis 7 l 0,5proz. Dikaliumarsenatlösung, die noch 0,05% freies Ammoniak enthält (bereitet aus 50 g Dikaliumarsenat mit 50 ccm 1proz. Ammoniak, auf 10 l aufgefüllt). Die Elution, die hellgelb ist und noch den schlechten Geruch der Autolysenflüssigkeit besitzt, wird durch Kieselgur auf gehärteten Filtern vollends geklärt.

Die Ausbeute betrug in unserem Beispiel 66% (M.Z.Q. 114), in vielen anderen über 70 bis 85%. Die Lösung läßt beim Kochen noch Protein ausflocken, sie wird reichlich von Bleiacetat sowie von Ferrocyankalium mit Essigsäure gefällt. Hefegummi enthält sie nicht. Kaolin adsorbiert aus ihr, wenn man mit Essigsäure ansäuert, das Invertin glatt. Aber wirksamer für die weitere Reinigung ist die Überführung in Tonerde.

Reinigung durch Tonerdeadsorption. Die 14 l Elution säuerten wir mit Essigsäure schwach an und versetzten sie mit 5,6 l Alkohol, nachdem mit einem Teil, einem Siebentel, die zur vollständigen Adsorption aus alkoholhaltiger Lösung nötige Menge Aluminiumhydroxyd ausprobiert worden. Sie betrug 74 g, davon wendete man 4/5 an. Da das Invertin gegen Alkohol schon recht empfindlich war, mußte die Operation mit nicht mehr als je 2 l Elution tunlichst rasch vorgenommen werden. Die Tonerdesuspension ließ man in dünnem Strahl unter starkem Rühren einlaufen und trennte die invertinbeladene in einer rasch auslaufenden Zentrifuge von der Mutterlauge ab, die Geruch und Farbe behielt. Das mit reinem Wasser dreimal gewaschene Adsorbat eluierten wir zwei Male, im ganzen mit 12 l 0,1 proz. Ammoniak, in anderen Versuchen nur etwa mit der Hälfte dieser Menge. Man kann nach dem Anrühren in den Bechern der Zentrifuge entweder in dieser die Hauptmenge des Tonerdeschlammes beseitigen und durch Absaugen mit einer dünnen Schicht Kieselgur auf gehärteten Filtern sehr rasch vollends klären [30] oder statt dessen die ganze Suspension auf gehärteten Filtern absaugen, was mehr Zeit erfordert.

Die Elution, fast farblos und geruchlos, gab noch zahlreiche Eiweißfällungen, blieb aber beim Aufkochen klar. Von ammoniakalischer Silberlösung wurde sie nicht, aber von Kupfersulfat stark gefällt. Die Elutionsausbeute betrug 70,5% (M.Z.Q. 80,5), aber als die Flüssigkeit vor der nächsten Fällung vorsichtig im Vakuum zum halben Volumen eingedampft werden mußte, sank der Invertinwert auf M.Z.Q. 71,7; aus dem Trockengewicht einer Probe berechnete sich für das Invertin der Elution der Zeitwert 2,75.

Eindampfen im Vakuum. Für vorsichtiges Abdampfen wäßriger Lösungen in großen Mengen fehlen den chemischen Laboratorien zweckmäßige Einrichtungen. Man pflegt mit zu geringer Wärmezufuhr zu destillieren, die Dämpfe durch zu enge Wege zu führen und gläserne Vorlagen anzuwenden, die für die Kühlung unbrauchbar sind. Die besten Ratschläge hat F. v. Soxhlet[1] bei der Beschreibung seines Verdampfapparates für große Flüssigkeitsmengen gegeben, der mit einem sehr wirksamen metallenen Doppelkugelkühler ausgestattet ist.

Die Versuchsanordnung von Soxhlet haben wir in einigen Beziehungen verbessert: z. B. durch Anwendung einer leistungsfähigen rotierenden Ölpumpe anstatt der Wasserstrahlpumpe, einer kupfernen 5 l-Saugflasche statt einer gläsernen als Vorlage, einer Sole von minus 20° zum Durchströmen des Metallkühlers und des die Vorlage enthaltenden Bottichs.

[1] Chem. Ztg. Bd. 18, S. 721 [1894].

Die Sole wird von einer im Keller direkt unterhalb des Arbeitsraumes stehenden Kohlensäure-Kältemaschine von L. A. RIEDINGER in Augsburg geliefert und von einer kleinen Zentrifugalpumpe durch eine gut isolierte Rohrleitung zu den Ventilen gedrückt, um von den Apparaten kontinuierlich wieder zum Solebehälter in den Keller zurückzufließen. Die Kältemaschine leistet für die Kühlung der Chlorcalciumlösung in der Stunde 2300 Calorien bei einem Kraftbedarf von 1,75 P. S. für den Kompressor. An Stelle des von SOXHLET angewandten [31] Wasserbades, dessen Dampferzeugung auch mit sechsfachem Brenner nicht ausreicht, verwenden wir ein an die Dampfleitung angeschlossenes Bad mit einer Filzauflage, um stärker erhitzen und die Wärmezufuhr dem Gang der Verdampfung besser anpassen zu können. Auf den Filzring ist fest aufgesetzt der kurz- und weithalsige Jenaer Glaskolben von 3/4 bis 5 l Inhalt, dem durch ein Nachsaugerohr ohne Unterbrechung der Destillation beliebige Flüssigkeitsmengen zugeführt werden. Die Wege des Dampfes (Kolbenhals, Ableitungsrohr) haben sehr große Durchmesser. Die Destillation wird, wie SOXHLET angegeben, mit Wasser begonnen, um Überhitzung der temperaturempfindlichen Lösungen vor Beginn des Siedens zu verhindern. Sobald sich Dampfblasen entwickeln, kühlt sich der Kolbeninhalt schnell ab, und wenn die gewünschte Temperatur erreicht ist, kann mit dem Nachsaugen der Enzymlösung begonnen werden. Da die nachströmende Flüssigkeit Luft enthält, ist es unnötig, eine Capillare anzuwenden. Das Zufließen wird mit einer Klemmschraube so reguliert, daß ebenso viel Lösung nachströmt als Wasser abdestilliert, so daß die Flüssigkeitsmenge im Kolben annähernd gleich bleibt. Wenn alle Lösung nachgesaugt ist, wird die Klemmschraube ganz geschlossen und das Nachsaugerohr durch eine Capillare ersetzt, da die Klemmschraube allein keine genügende Regelung des Luftstromes erlaubt. Um die Destillation abzubrechen, läßt man nach dem Abstellen des Dampfes die Temperatur im Kolben weiter sinken, vermehrt das Einströmen der Luft durch die Capillare und unterbricht die Verbindung zwischen Vorlage und Pumpe.

Die Destillationstemperatur beträgt 14 bis 17° (bei SOXHLET unter Anwendung einer Kältemischung 24 bis 26°), die Leistung in der Stunde 2 bis 3 l.

Dialyse[1]. Die Kollodiumdialysatoren waren bei mäßiger Dicke für Invertin nicht undurchlässig, sie sind aber auch als leicht hydrolysierbare und leicht reduzierbare Salpetersäureester der Cellulose nicht so indifferent und harmlos, wie [32] gewöhnlich angenommen wird. Wir verwenden als Dialysatoren die sog. Fischblasen des Handels und halten durch ununterbrochenes Einleiten von Stickstoff die Flüssigkeit in lebhafter Bewegung. Die Dialyse erfolgt gegen strömendes destilliertes Wasser und dauert gewöhnlich 3 Tage. Leider sind aber auch diese Dialysatoren unzuverlässig. Die Proteinsubstanz dieser Häute unterliegt Zersetzungen, ihre stickstoffhaltigen Abbauprodukte gehen in die Enzymlösungen über. Überdies ist es nicht ausgeschlossen, daß diese Membranen Invertin aus seinen reinen Lösungen adsorbieren.

[1] Vgl. den Abschnitt „Zur Dialyse" in Abhandlung I, S. 88.

Zweite Bleifällung. Das Verhalten des Invertins ist nach der Reinigung mit Aluminiumhydroxyd noch in solchem Maße von seinen Begleitstoffen abhängig, daß man für die weiteren Fällungen mit Bleiacetat nur Beispiele, aber keine Regeln geben kann. In unserem Versuche, den die Tab. 7 vollständiger darstellt, als es in der Beschreibung geschehen kann, sind 4/5 des aus dem Tonerdeadsorbat eluierten Invertins bei der zweiten Fällung mit Bleiacetat in den Niederschlag gegangen, während in einem anderen, sonst ähnlichen Versuche, den die Tab. 8 wiedergibt, die Fällung das Enzym sogar quantitativ enthielt.

Dabei, aber vielmehr bei noch höherem Reinheitsgrad hat auch die Verdünnung des Invertins einigen Einfluß. Wenn seine verdünnte Lösung auf Zusatz von Bleiacetat klar bleibt, so gibt sie gewöhnlich nach dem Einengen weitere, oft noch beträchtliche

[33] Tabelle 7. Beispiel der Fraktionierung durch Bleifällung.

I. 13 kg Brauereihefe, Zeitw. **286**, M.Z.Q. = 230

↓

26,5 l Autolysat, Zeitw. bez. auf Trockengewicht **180**, M.Z.Q. = 172

↓

Vollständige Bleiacetatfällung

↓

Elution durch Arsenat, 66 %, M.Z.Q. = 114

↓

Tonerdeadsorbat

↓

Elution durch Ammoniak, 70,5 %, M.Z.Q. = 80,5, nach Eindampfen 71,7 (Zeitw. **2,75**)

↓

II. Bleiacetatfällung 70 % ; Restlösung 21 %, M.Z.Q. = 15, eingedampft (durch Verlust 10)

↓

Elution durch Arsenat, 89 %, M.Z.Q. = 50,4 (Zeitw. **0,35**)

↓

III. Bleiacetatfällung 26 % ; Restlösung 74 %, M.Z.Q. = 30,8

Elution durch Arsenat 38 % M.Z.Q. 4,0	IV. Bleiessigfällung	Restlösung M.Z.Q. = 42,6
↓	↓	↓
Eingeengt M.Z.Q. 3,3, Dialysiert 2,3 Präparat *p* (Zeitw. **0,29**) (P-Gehalt 0,02)	Elution durch Arsenat 56 % M.Z.Q. = 2,3	eingeengt M.Z.Q. = 30,4
	V. Bleiessigfällung	Restlösung
	↓	↓
	Elution durch Arsenat 10 % M.Z.Q. = 0,53	M.Z.Q. nach Dialyse 25 Präparat n_1 (Zeitw. **0,636**) (P-Gehalt **0,006**)
	↓	↓
	Dialysiert M.Z.Q. = 0,3 Präparat o (Zeitw. **0,54**)	a. d. Hälfte Tonerdeadsorbat
		↓
		Phosphatelution 29 % M.Z.Q. = 3,6
		↓
		Dialysiert und eingeengt M.Z.Q. = 2,6 Präparat n_2 (Zeitw. **0,35** bis **0,48**) (P-Gehalt 0,078)

[34] Tabelle 8. Zweites Beispiel der Reinigung durch Bleifällungen.

[illegible] l Neutralautolysat M.Z.Q. [illegible], Zeitw. [illegible], auf Trockengewicht 250

↓

Erste Bleiacetatfällung (vollständig)

↓

Elution durch Phosphat [illegible] %, M.Z.Q. [illegible]

↓

Tonerdeadsorbat

↓

Elution durch Ammoniak [illegible] %, M.Z.Q. [illegible], nach Eindampfen [illegible]

↓

Zweite Bleiacetatfällung (vollständig)

↓

Elution durch Arsenat [illegible] %, M.Z.Q. [illegible]

Verarbeitung der ersten Hälfte:

Nach Ausfällen des Arsens M.Z.Q. [illegible]

Dritte Bleiacetatfällung [illegible] %	Restlösung [illegible] %, M.Z.Q. [illegible]
↓	↓
Elution durch Arsenat [illegible] %, beim Stehen zersetzt	Eingeengt M.Z.Q. [illegible]
	↓
	Dialysiert M.Z.Q. [illegible]
	↓
	Eingeengt M.Z.Q. [illegible]
	Präparat *l* (Zeitw. 0,20, P-Gehalt [illegible])

Verarbeitung der zweiten Hälfte:

Dritte Fällung durch Bleiessig (vollständig)

↓

Elution durch Arsenat [illegible] %, M.Z.Q. [illegible]

↓

Nach Ausfällen des Arsens M.Z.Q. [illegible]

↓

Eingeengt M.Z.Q. [illegible]

↓

Dialysiert M.Z.Q. [illegible]

Präparat *m* (Zeitw. 0,29, P-Gehalt [illegible])

Fällungen. Die Konzentrationsunterschiede bei der zweiten Reinigung mit Bleiacetat waren nicht groß. Der Menge-Zeit-Quotient 1 war in unserem Versuche in 105 ccm, in anderen Beispielen in 75 bis etwa 200 ccm enthalten.

Die ganze Menge der Elution versetzten wir allmählich und vorsichtig mit dem Bleiacetat, indem wir in einer Probe mittels einer kleinen Zentrifuge untersuchten, ob die Flüssigkeit noch weiteren Zusatz vertrug, ohne daß Blei in der klaren Lösung mit Schwefelwasserstoff nachweisbar wurde. Erforderlich waren hier 20 g Bleizucker. Die Hauptmenge des Niederschlags setzte sich beim Zentrifugieren gut ab, die Restlösung ließ sich aber erst durch Kieselgurfiltration klären. Diese [35] Mutterlauge (M.Z.Q. = 15) wurde gemeinsam mit der die Hauptmenge des Invertins enthaltenden weiteren Restlösung (M.Z.Q. = 36,8) verarbeitet, welche die Elution des zweiten Bleiniederschlags bei erneuter Fällung mit Bleiacetat hinterließ. Die vereinigten, von den Bleiniederschlägen abgetrennten Flüssigkeiten wurden ein viertes und nach Einengen ein fünftes Mal, und zwar nun mit basischem Bleiacetat gefällt, bevor aus der letzten Restlösung (M.Z.Q. = 25) durch Dialyse und Eindampfen das Analysen-

präparat n_1, nach erneuter Reinigung mittels der Tonerdeadsorption das Präparat n_2 hervorging.

Diese Invertinpräparate aus den Restlösungen sind infolge der genügend oft wiederholten Abscheidung von Bleiniederschlägen die phosphorärmsten. Ihnen steht gegenüber das Invertin der Bleiacetatfällung, das den Phosphor mitschleppt. Aber auch hier gelingt es, dadurch, daß Phosphorkörper beim Eluieren in den Bleiverbindungen zurückgelassen werden, sehr phosphorarme Präparate zu isolieren. Zu diesem Zweck wurde das Invertin aus der zweiten Bleifällung durch Arsenat eluiert; aus der Elution (3 l, M.Z.Q. = 50) nach Ausfällung der Arsensäure mit Magnesiumacetat, Ammoniak und Ammoniumchlorid zum dritten Male mit Bleiacetat (6 g) gefällt und wiederum mit Kaliumarsenat (nun von 0,25prozentigem mit 0,05% Ammoniak) freigelegt. Die Elutionsausbeute belief sich dabei auf 38% gegenüber 22% in der entsprechenden Phase des Versuchs der Tab. 8. Es ist wahrscheinlich, daß eben dieser Schwerzerlegbarkeit der dritten oder einer noch späteren Bleifällung die enzymatische Reinheit, namentlich der niedrige Phosphorgehalt dieser Fraktionen zu verdanken ist.

Schon in der Elution aus der zweiten Bleifällung hat das Invertin einen die bisher beschriebene Konzentration übertreffenden Reinheitsgrad erreicht, der durch den Zeitwert **0,35** der Lösung ausgedrückt wird. Er ist durch die weiteren Fraktionierungen, welche die Tab. 7 verzeichnet, nur noch ganz wenig verbessert worden; die Zeitwerte der Präparate n_2, o und p senken sich bis zu **0,29**, die besten Zeitwerte, diejenigen der Präparate l und m der Tab. 8 bis zu **0,29** und **0,20**. Die Zersetzlichkeit des an Schutzstoffen armen Enzyms und die Neuaufnahme von Beimischungen, hauptsächlich aus [36] der Dialysatorsubstanz, haben die durch weitere Anwendungen der Adsorptionsmethoden erzielten Verbesserungen aufgehoben.

In einem anderen, mit 18 l Autolysat nach Hudson (M.Z.Q. = 78,2) ausgeführten Versuche, q der Tab. 6, erreichte die Arsenatelution (M.Z.Q. = 27,8) aus der zweiten Bleifällung bei einer Ausbeute von 87% den Zeitwert **0,26**.

Es scheint, daß die Präparate aus den Bleifällungen, die schon früh im Gang der Reinigung den Hefegummi verloren haben, etwa vom Zeitwert 0,35 an empfindlich werden, also schon in der Elution aus dem zweiten Bleiniederschlag. Nach den weiteren Bleifällungen ist in den Elutionen und in den Restlösungen die Zersetzlichkeit noch gesteigert. Die Lösungen werden schon bei mäßigem Einengen im Vakuum enzymatisch schwächer, weitere Einbußen an Invertin erleiden sie bei der Dialyse, nochmaliger Verlust trat bei vollständigem Eindampfen ein. In diesen Erscheinungen war aber keine Regelmäßigkeit. Wir beobachteten Invertinlösungen, die ihre enzymatische Wirksamkeit beim Stehen teilweise oder gänzlich einbüßten, andere, in denen die Abnahme bis zu einem gewissen Punkt fortschritt und dann stillstand, endlich auch ganz haltbare Lösungen. Namentlich die eingeengten reinen Lösungen nach der Dialyse änderten bei wochenlanger oder sogar monatelanger Beobachtung ihren Invertinwert, wie die Tab. 9 zeigt, fast gar nicht.

Tabelle 9. Beständigkeit von Invertinlösungen beim Stehen.

Nr.	Präparat	Dauer der Beobachtung Tage	Reaktionskonstante am Beginn	am Ende	Abnahme in %
[illegible]	α_1 der Tab. 7:				
	1 proz. Lösung	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	0,5 proz. Lösung	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	0,5 proz. Lösung	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible] der Tab. 8:				
	0,2 proz. Lösung	12	[illegible]	2,14	[illegible]
	α_2 der Tab. 8:				
	0,1 proz. Lösung	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[37] In der ersten Abhandlung ließen wir nur die Zeitwerte gelten, die den trocken isolierten Invertinpräparaten (Nr. 171 und 172, 0,80, Nr. 173, 0,725, Nr. 174, 0,67) nach dem Wiederauflösen zukamen oder ausnahmsweise nach der Dialyse unmittelbar vor dem Abdampfen (Nr. 174 0,55). Es war auch in einer Anzahl von Fällen (S. 100 und 101) schon erreicht worden, daß Eindampfen und Dialyse ohne Verlust verlief, während in anderen Beispielen bei den letzten Operationen Enzymeinbuße vorkam. Von den Ergebnissen der Reinigung und Fraktionierung nach der Bleifällungsmethode läßt sich nun ein zutreffendes Bild nur mit den Invertinzeitwerten der Lösungen vor den letzten Vornahmen geben. Daher sind in die Tab. 6, 7 und 8 die Zeitwerte der neuen Präparate aufgenommen, die aus den Trockengewichten und den enzymatischen Wirkungen vor dem Eindampfen berechnet sind, und diese Zahlen wurden auch [38] hier angeführt. Wenn keine Ausflockung eintrat und keine Filtration nötig war, so setzte man also die Invertinwirkungen der Elutionen und der Restlösungen

Tabelle 10. Abnahme der Invertinwirkung beim Eindampfen und Dialysieren.

Präparat	1. Verdünnte Lösung, Restlösung oder Elution vor Einengen und Dialyse	2. Eingeengte Lösung vor Dialyse	3. Dialysierte Lösung vor dem Eindampfen	4. Nach Dialyse und nach starkem Einengen	5. Trockenpräparat nach Wiederauflösen
Elution d. 2. Bleifall. Tab. 6	0,35		1,3		
α der Tab. 7	bleihaltig, nicht bestimmt		[illegible]	[illegible]	
[illegible] der Tab. 7	0,54		[illegible]		
[illegible] der Tab. 7	0,29	0,44	0,62	[illegible]	
[illegible] der Tab. 8	[illegible]	0,24	[illegible]	[illegible]	[illegible]
α der Tab. 8	0,29	0,325	[illegible]	[illegible]	
[illegible] der Tab. 6			[illegible]		[illegible]
[illegible] der Tab. 6	[illegible]	[illegible]			
[illegible] der Tab. 6	[illegible]	[illegible]			
[illegible] der Tab. 6	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible] b. Zus. v. Gummi [illegible] Zus.
[illegible] der Tab. 6	0,44	0,51	[illegible]		
[illegible] der Tab. 6	filtriert	0,67	[illegible]		2,1
[illegible] der Tab. 6	0,93	1,25	2,1		

vor dem Einengen, Dialysieren und Abdampfen in die Rechnung ein. Diese Darstellung der Reinheitsgrade soll in der Tab. 10 durch die viel ungünstigeren Zahlen ergänzt werden, welche die Invertinpräparate nach den letzten Operationen ergeben haben.

Die neuen Präparate geben, wie die folgende Zusammenstellung zeigt, keine charakteristischen Reaktionen, manche liefern zwar mit Pikrinsäure und mit Phosphorwolframsäure Niederschläge oder Trübungen, aber wahrscheinlich nur infolge von Verunreinigungen, die aus der Substanz des Dialysators stammen.

Verhalten einiger Invertinpräparate.

	Abhandlung I, Nr. 173 u. 174 (Zeitwert 0,72 bis 0,5[illegible]; 0,2 proz.)	Abhandlung II, Nr. 1 (Zeitwert 1, [illegible] proz.)	I (Zeitw. [illegible]; [illegible] proz.)	II (Zeitw. [illegible]; [illegible] proz.)
Bleiacetat	schwacher Niederschlag			
Bas. Bleiacetat	starke Fällung		Trübung	
Uranylacetat				
Fehlingsche Lösung		ein wenig Niederschlag		
Fehling nach Erhitzen mit Säure		reduziert		
Millonsche Reaktion				
Biuretprobe				
Probe von Molisch		positiv		

C. Phosphorgehalt der Präparate.

1. Die analytischen Methoden.

Von den folgenden analytischen Angaben, die sich auf die verschiedenen Präparate und auf verschiedene Fraktionen der wenigen genauer untersuchten Präparate beziehen, sind allein [39] die den Phosphorgehalt betreffenden abschließend. Dagegen sind die C-, H- und N-Bestimmungen nur Vorarbeiten, welche die Mängel unserer präparativen Methoden aufdecken sollen. Namentlich die Stickstoffgehalte des Invertins sind noch wesentlich gefälscht durch Beimischungen, die bei der Fortführung der Versuche vermieden werden müssen.

Die Grundlagen unserer analytischen Angaben werden in einer demnächst folgenden Abhandlung von R. Kuhn*: „Zur Mikrobestimmung der Phosphorsäure" eingehend behandelt. Darin wird erreicht, daß die alkalimetrische Bestimmung der Phosphorsäure im Molybdatniederschlag sowie die gravimetrische Bestimmung als Molybdat bis zu sehr geringen Phosphormengen anwendbar werden (die maßanalytische bis unterhalb von 0,1 mg P, die gewichtsanalytische bis 0,03 mg P) und das Gebiet der nephelometrischen Phosphorbestimmung (ungefähr von 0,2 mg P an abwärts) beträchtlich überschneiden. Die bisherige Lücke zwischen der üblichen analytischen Bestimmung und der nephelometrischen suchten schon H. v. Euler und O. Svanberg[1] in ihrer Arbeit über den Phosphorgehalt des Invertins zu überbrücken. Für den Bereich von 0,1 bis 0,5 mg P empfehlen v. Euler und Svanberg eine auf ± 10%

* Abh. 14. [1] Diese Zs. Bd. 112, S. 282 [1921].

genaue Mikrobestimmung, die auf empirischer Kalibrierung der so geringen Phosphorsäuremengen bei der Titration der Molybdatfällung mit $^n/_{2}$-NaOH beruht.

Die folgenden Phosphoranalysen, ausschließlich Mikrobestimmungen, sind nach Zerstörung der organischen Substanz durch die Soda-Salpeter-Schmelze in einem Platinschiffchen zum Teil nach dem Verfahren von H. LIEB[1] gravimetrisch ausgeführt, zum Teil nephelometrisch nach H. KLEINMANN[2]. Die Gewichtsbestimmungen werden bis zu P-Gehalten von 0,3 oder 0,2% angewendet, und zwar bei so phosphorarmen Präparaten mit 20 bis 10 mg Substanz entsprechend 0,05 bis 0,03 mg P und [40] 2 bis 3 mg Molybdatfällung; der mögliche Fehler betrug ± 2% vom gefundenen P.

Für die noch viel phosphorärmeren Präparate z. B. Invertin mit 0,006% P war die mit Strychninphosphormolybdat in salzsaurer Lösung ausgeführte nephelometrische Bestimmung nach H. KLEINMANN sehr befriedigend. Die Phosphormengen gingen herunter bis 0,0006 mg in 25 ccm, die angewandte Substanz betrug 10 mg, der Molybdatniederschlag würde 0,05 mg ausmachen, der mögliche Fehler stieg auf ± 10% vom gefundenen P, bei etwas größeren Mengen nur auf ± 5%.

Die Phosphorbestimmung in den infolge der Elution durch Arsenat aus Bleifällungen arsenhaltigen Präparaten geschah mikroanalytisch nach Entfernung des Arsens entsprechend der von P. JANNASCH und T. SEIDEL[3]) empfohlenen „Bestimmung und Trennung des Arsens durch einfaches Kochen seiner salzsauren Lösung bei Gegenwart von Hydrazinsalzen und Bromkali". Das Arsen selbst ermittelten wir ebenfalls mikroanalytisch nach dem in F. P. TREADWELLS Quantitativer Analyse (7. Aufl., 1917, S. 172) angeführten Verfahren von C. R. SANGER und O. F. BLACK[4]), in diesem Falle nach Veraschung mit Neumannschem Säuregemisch.

2. Phosphorhaltiges Invertin.

Unsere Bestimmungen des organisch gebundenen Phosphors in den nach WILLSTÄTTER und RACKE mittels der Adsorptionsmethode gereinigten Präparaten zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von H. v. EULER und O. SVANBERG Proportionalität zwischen Phosphorgehalt und enzymatischer Wirksamkeit. Das Produkt Zeitwert · % P liegt in einigen Beispielen von sehr weit differierendem Reinheitsgrad (Minutenwert 12 bis 1) und aus sehr verschiedenen Darstellungsweisen in den engen Grenzen 2,2 bis 2,4. Für die Präparate von EULER und SVANBERG berechnet sich allerdings ein etwas niedrigeres Produkt, nämlich 1,44 und 1,53. Diese Differenz könnte wohl dadurch erklärt werden, daß andere kohlehydratspaltende [41] Enzyme, die in ihrer Zusammensetzung der Saccharase nahestehen würden, diese in wirksamem oder verdorbenem Zustand begleiten und zwar bei verschiedenen Hefen in verschiedenen Mengenverhältnissen. Der Quotient Saccharasezeitwert : Raffinasezeitwert beträgt

[1] H. LIEB in F. PREGL, Die quantitative organische Mikroanalyse, Berlin 1917; H. LIEB in Abderhaldens Hdb. d. biolog. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 3, Liefg. 16, S. 64 [1921].

[2] Biochem. Zs. Bd. 99, S. 19, 45, 95, 115, 150 [1919].

[3]) Jl. für prakt. Chem. [2] Bd. 91, S. 133 [1914/15].

[4]) Jl. Soc. Chem. Ind. Bd. 26, S. 1115 [1907].

z. B. bei Löwenbrauereihefe ungefähr 11,3, bei dänischer Brauereihefe nur 5,1[1]. Auf ein und dieselbe Menge Saccharase, die gemessen wird, kann bei Verarbeitung verschiedener, z. B. bayerischer oder schwedischer Brauereihefe, eine mehr oder weniger große Menge ähnlich zusammengesetzter anderer Zuckerenzyme treffen und bei allen Adsorptionsvorgängen mitgehen. Es ist schon bekannt[2], daß nicht einmal die Elution eines Saccharase-Maltase-Adsorbates in Tonerde durch Saccharose oder Maltose oder eines Saccharase-Raffinase-Adsorbates durch Saccharose spezifisch genug ist, um die zwei Enzyme zu trennen oder auch nur das Verhältnis zwischen ihnen zu verschieben.

Präparat	Zeitwert	Angew. Substanz (mg)	Gef. Molybdatfällung (mg)	P %	Proz. P · Zeitwert
Nr. 1. Invertin aus fraktioniert. enzymat. Entleerung, 1. Präp., Abh. II, S. 138	1,4	12,10	14,31	1,72	2,41
Nr. 2. Ebenso, 2. Präparat	1,0	10,24	15,23	2,16	2,16
Nr. 3. Invertin, Reinigung nur durch Tonerdeadsorbat, Elut. m. Phosph., Dialyse, Acetonfällung	12,0	23,44	2,06	0,183	2,20
Nr. 4. And. Präp., ähnlich gereinigt	4,7	17,10	5,03	0,504	2,37

[42] Gesetzt, das Invertin und die ähnlichen Enzyme seien Phosphorverbindungen, dann wäre der Phosphorgehalt ein besseres Maß für die enzymatische Reinheit und Konzentration eines Präparates als die spezifische Zuckerspaltung durch eine Enzymkomponente.

Die Kombination der Bleifällung und Tonerdeadsorption führte bei einigen der ersten Beispiele zu den Präparaten *d* und *i* der Tab. 6 mit zwar noch hohem Phosphorgehalt, aber doch niedrigerem Produkt aus demselben mit dem Zeitwert. Es handelt sich nur um organisch gebundenen Phosphor; 5,30 mg Präparat *i* gaben, bei 70° mit dem Molybdänreagens versetzt, in 24 Stunden keine Trübung.

Präparat	Zeitwert	Angew. Substanz (mg)	Gef. Molybdatfällung (mg)	P %	Proz. P · Zeitwert
Nr. 5. Präparat *d* der Tab. 6	0,9	11,23	0,70	1,25	1,13
Nr. 6. Präparat *i* der Tab. 6	1,0	12,00	15,85	1,83	1,83

Bei zwei weiteren Präparaten f_1 und f_2 (Tab. 6) gelang es noch ohne wesentliche Verbesserung des Verfahrens, die Phosphorzahl weiter herabzumindern. Sie war nicht mehr dem Zeitwert umgekehrt, sondern annähernd direkt proportional.

Nr. 7. Präparat f_1 der Tab. 6	0,82	16,74	6,40	0,57
Nr. 8. Präparat f_2 der Tab. 6	0,44	9,00	2,24	0,33

3. Fraktionierung des Invertins.

Daraus geht hervor, daß für die hohe Phosphorzahl, zum mindesten für 90% des Phosphors, ein oder mehrere hartnäckige Begleiter verantwortlich sind. Entweder haben sie sich bei den Präparaten f_1 und f_2 in den Restlösungen angereichert,

[1] R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921]; mit dem Maltasezeitwert gibt der Saccharasezeitwert noch viel weiter differierende Quotienten, vgl. R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 211 [1921].

[2] R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 116, S. 53 [1921].

oder die Elution des Bleiniederschlags, und zwar der zweiten Fällung, ist für die Saccharase spezifischer [43] geworden. Über diese Möglichkeiten läßt sich bei der zweiten Bleifällung durch eine Fraktionierung entscheiden, nämlich durch den Vergleich des Invertins in der Restlösung *h* (Tab. 6) von der Bleifällung und in der Elution des Niederschlags g.

Nr. 9. Restlösung *h*. Zeitwert [illegible]

23,?? mg gaben 3,72 mg Molybdatfällung. Nach PREGL gaben 5,352 mg Substanz [illegible] mg Asche, 9,83 mg CO_2 und 3,31 mg H_2O. Mikro-Dumas: 5,100 mg gaben [illegible] ccm trockenen Stickstoff (nach der Preglschen Korrektur von 2%) bei 21° und 72? mm. Bestimmung des leicht abspaltbaren Ammoniaks nach dem Vorbild des Mikro-Kjeldahl: 6,10? mg gaben bei erschöpfender Destillation mit 20proz. Kalilauge Ammoniak entspr. [illegible] ccm n/70 HCl, d. i. 2,26% N (2,29% für aschefreie Substanz).

Nr. 10. Elution g aus der zugehörigen Bleifällung. Zeitwert 0,85.

5,352 mg gaben aus der Asche der nachstehenden Elementaranalyse [illegible] mg Molybdatfällung. Nach PREGL gaben 5,352 mg Substanz 0,730 mg Asche, [illegible] mg CO_2 und 2,08 mg H_2O. Mikro-Dumas: 2,710 mg gaben 0,20? ccm trockenen Stickstoff (korr.) bei 20,5° und 72? mm. Bestimmung des abspaltbaren Ammoniaks: [illegible] mg gaben bei der Destillation mit 20proz. Kalilauge Ammoniak entspr. [illegible] ccm n/70 HCl, d. i. 4,0?% N (?,?8% für aschefreie Substanz).

a) Präp. *h*				b) Präp. *g*			
Asche	1,24%	Aschefreie Subst.		Asche	13,?%	Aschefreie Subst.	
P	0,226			P	1,0?		
C	48,03	C	48,68%	C	[illegible]	C	[illegible]%
H	6,64	H	6,7?	H	6,20	H	[illegible]
N	14,13	N	14,3?	N	[illegible]	N	14,8?

Der Phosphorkörper hat sich in dem gefällten Anteil angereichert und ist vollständiger als bei den Präparaten f_1 und f_2 eluiert worden. Es wird daher erreichbar sein durch wiederholte fraktionierte Fällung mit Bleiacetat die Restlösung noch ärmer und frei von Phosphor zu gewinnen. Schwieriger ist es, im gefällten Anteil den Phosphor abzutrennen. Wenn aber schon in den Hefeauszügen die Anwesenheit der Phosphorsäure unvermeidbar ist, so sind doch die Phosphate wenigstens als Eluentien zu umgehen. Der hartnäckig anhaftende Phosphor kann in Form von adsorptiv festgehaltenen, sehr träge dialysierbaren Phosphationen vorliegen. Zu ihrer Entfernung kommt [44] nach den eindringenden Untersuchungen von W. PAULI[1] an anorganischen Kolloiden und nach den wichtigen Beobachtungen von M. SAMEC[2] über Amylophosphorsäure entweder Elektrodialyse oder Ersatz durch analytisch leicht zu unterscheidende, isomorphe Ionen in Betracht. Der letztere Weg, nämlich die Anwendung von Arsensäure statt der Phosphorsäure führt bei der Elution der invertinhaltigen Niederschläge zum Ziel, da sowohl die Tonerdeadsorbate wie die Bleifällungen sich gegen Arsenate, übrigens auch gegen andere dreiwertige Anionen wie Citrate, quantitativ ebenso wie gegen Phosphate verhalten.

[1] Der allgemeine Bauplan der Kolloide, Kolloid-Zs. Bd. 28, 2. S. 49 [1921].
[2] Kolloidchem. Beihefte Bd. 6, S. 23 [1914]; M. SAMEC und H. HAERDTL, IX. Mitt., ebenda, Bd. 12, S. 281 [1921].

Auf diese Weise ist bei der Restlösung *l* zum ersten Male erreicht, daß der Phosphorgehalt 10mal niedriger ausfällt als oben bei der Restlösung *h* und bei der zu *l* gehörenden Elution der Bleifällung *m*.

Nr. 11. Restlösung *l*, Zeitwert 0,20.

17,194 mg gaben nach Abdestillieren des Arsens nephelometrisch 0,0047 mg P. — Nach PREGL gaben 5,801 mg Substanz 0,226 mg Asche, 8,067 mg CO_2 und 2,57 mg H_2O. — Mikro-Dumas: 2,492 mg gaben 0,280 ccm trockenen Stickstoff (korr.) bei 22,5° und 715 mm. — 10,48 mg gaben 1,40 mg phosphathaltiges Ammoniumarsensäurestrychninmolybdat (vgl. die Phosphorbestimmung von G. EMBDEN[1]).

Nr. 12. Elution *m*, Zeitwert 0,20.

11,03 mg gaben 2,27 mg Molybdatfällung. — 0,19 mg gaben nach Abdestillieren des Arsens nephelometrisch 0,0273 mg P. — Nach PREGL gaben 6,162 mg Substanz 0,947 mg Asche, 8,705 mg CO_2 und 3,435 mg H_2O. — Mikro-Dumas: 2,001 mg Substanz gaben 0,272 ccm trockenen Stickstoff (korr.) bei 19,0° und 708 mm.

11) Präp. *l*				12) Präp. *m*			
Asche	3,90 %	Aschefreie Subst.		Asche	15,37 %	Aschefreie Subst.	
P	0,027			P	0,207		
As	0,3 ± 0,2			As	0,000		
C	42,30	C	44,02 %	C	38,53	C	45,53 %
H	4,06	H	5,16	H	6,24	H	7,37
N	12,21	N	12,71	N	14,80	N	17,40

[45] Die Kombination der fraktionierten Bleifällung und der Arsenatelution führte in dem Versuche der Tab. 7 zum Ziel. Nach 5 Fällungen, davon 4 fraktionierten, mit Bleiacetat und Bleiessig wurde eine Restlösung n_1 gewonnen, die noch 35 % des vor der ersten Fraktionierung vorhandenen Invertins enthielt mit einem Phosphorgehalt von nur mehr 0,006 %. Auch in dem gefällten Anteil *p* (Zeitwert 0,29) war der Phosphorgehalt auf 0,02 % herabgedrückt.

Nr. 13. Restlösung n_1, Zeitwert 0,50.

10,10 mg gaben nach Abdestillieren des Arsens 0,00005 mg P.
17,08 „ „ „ „ „ „ 0,00105 „ P.

Nr. 14. Elution *p*, Zeitwert 0,20.

10,70 mg gaben nach d. Arsendestill. nephelometrisch 0,00216 mg P.

Präp. n_1		Präp. *p*	
P	0,0004 %	P	0,021 %
P	0,0001		

D. Abhängigkeit des Invertins von der Verteilung und der Reinheit.

I. Theoretischer Teil.

Die leitende Betrachtung in diesen Arbeiten gründet sich auf die Beobachtung, daß sich das Invertin mit Begleitstoffen assoziiert findet, die auf einen gewissen Teil seiner Eigenschaften Einfluß haben, und sie gipfelt in der Auffassung, daß das Enzym aus einem kolloiden Komplex besteht, dessen aktive Gruppe rein chemisch wirkt. Für die Einflüsse der Begleitstoffe und der Verteilung sollen die Grenzen gesucht werden. Wie weit sind die Eigenschaften des Invertins vorgetäuscht oder verhüllt

[1] Abderhaldens Hdb. d. biolog. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 3, Heft 5, S. 913 [1921].

durch die zufällig mit ihm vergesellschafteten Stoffe und wie weit ist die Wirkung des Invertins von seinen kolloiden Eigenschaften bedingt. Wenn die Wirkung des Invertins auf den Rohrzucker rein chemisch, nicht als Kolloidfunktion erklärt wird, also ohne Abhängigkeit von Verteilung und Teilchengröße, ist es dann doch möglich, daß die enzymatische Aktivität mit dem kolloiden Zustand des Enzyms steht und fällt?

[46] Diese Fragen scheinen nicht beantwortet, kaum gestellt zu sein. Entweder wurden die Enzymwirkungen vom Standpunkt des Massenwirkungsgesetzes und der Theorie der Elektrolytlösungen, oder sie wurden als Kolloidphänomene betrachtet.

1. Zur Geschichte.

W. M. Bayliss[1] wie auch G. S. Hedin[2] sowie J. M. Nelson[3] betrachten den Primärvorgang der Enzymreaktion nicht als spezifisch chemisch, sondern physikalisch. Die Abhängigkeit der Invertinwirkung von der Rohrzuckerkonzentration und die Invertinkinetik sucht Nelson als Adsorptionsvorgänge kolloidchemisch zu erklären. Nach Bayliss kommt die Enzymwirkung zustande durch eine spezifische Adsorption des Substrats an Enzymteilchen, nicht als eine Zwischenreaktionskatalyse infolge chemischer Affinität zwischen Enzym und Substrat, sondern durch bloße Konzentrationserhöhung der Komponenten Substrat und Wasser an den Grenzflächen der Enzymteilchen. „We may suppose that, in hydrolysis, for example, the substrate is brought into intimate relation with water on the surface of the particles of the enzyme." „It must be understood, that adsorption is merely a preliminary stage, and that, after it has taken place, the proper chemical reaction makes its appearance. The rate at which this reaction proceeds is controlled by mass-action on the part of the adsorbed substances and is, therefore, in proportion to the amount adsorbed[4]."

Würde man aber in das Massenwirkungsgesetz im Sinne von Bayliss statt der ganzen Konzentration des Rohrzuckers nur seinen vom Enzym adsorbierten Anteil als aktive Masse einsetzen, so käme man nach L. Michaelis[5] zu einem [47] Widerspruch mit der Affinitätskonstante, die dieser mit der Gesamtkonzentration des Rohrzuckers als aktiver Masse ableitet.

Während Bayliss die Adsorption spezifisch annimmt, gipfeln die Forschungen über Fermentwirkung, besonders über die Spaltung von Polypeptiden durch Hefeauszüge, von E. Abderhalden und A. Fodor[6]), von A. Fodor[7]) allein und von E. Ab-

[1] The Nature of Enzyme Action, 3. Aufl. London [1914].
[2] Die physikalische Chemie und ihre Beziehungen zur Biologie. Wiesbaden [1910].
[3] J. M. Nelson und W. C. Vosburgh, Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 39, S. 790 [1917]; vgl. W. C. Vosburgh, Diss. Columbia University 1916, ferner K. G. Falk, The Chemistry of enzyme actions, S. 100ff. New-York [1921].
[4] a. a. O., S. 107 u. 108. [5] Biochem. Zs. Bd. 115, S. 269 [1921].
[6]) Fermentforschung Bd. 1, S. 533 [1916]; Bd. 2, S. 74 [1917]; Bd. 2, S. 151, 211 u. 225 [1918]; Bd. 4, S. 191 [1920].
[7]) Fermentforschung Bd. 3, S. 193 [1919]; Bd. 4, S. 209 [1920].

derhalden und H. Handovsky[3] in der Annahme einer allgemeinen Adsorption von Substrat an Enzym. „Es ist also nicht die Kombination von Substrat und Ferment spezifisch, sondern die Spaltung als solche[4]." Für die spezifischen Enzymwirkungen wird die Möglichkeit chemischer Reaktion, nämlich sekundärer, zwischen Enzym und Substrat in den Adsorbaten eingeräumt.

Die Enzyme erscheinen nach Fodor[5] als Biokolloide aus den Gruppen chemisch bekannter Verbindungen, die ihre Wirkungen besonderen Dispersitätsgraden verdanken. Invertin[6] wird als Hefegummi, peptidspaltendes Ferment[7] als Hefephosphorproteid erklärt.

Die Annahme primärer Adsorptionsvorgänge vermeidet die dieser kolloidchemischen Betrachtung entgegengesetzte Theorie von L. Michaelis[8], welche die Kinetik der enzymatischen Rohrzuckerhydrolyse nach den für homogene Lösungen geltenden Gesetzen verfolgt. Aus dem Einfluß der Spaltungsprodukte auf die Anfangsgeschwindigkeit und aus den Anfangsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen berechnet Michaelis in dieser grundlegenden Arbeit für die enzymatische Rohrzuckerspaltung zum ersten Male die Affinitätskonstante eines Enzyms zu seinem Substrat.

[48] Am entschiedensten sind die enzymatischen Vorgänge chemisch aufgefaßt bei H. v. Euler[1]) und seinen Mitarbeitern, was nicht so sehr bei Bestimmungen der Affinität des Enzyms zum Substrat und seinen Spaltprodukten hervortritt, wie besonders in den Untersuchungen der Vergiftung[2]) durch Amine oder durch Schwermetallsalze. Diese Erscheinungen werden auf einfache chemische Modelle zurückgeführt; so werden aus Bestimmungen der Affinität zwischen Aldehyden und Aminen und aus dem Vergleich mit der Enzymvergiftung indirekte Aufschlüsse über die chemisch wirksamen, aktiven Gruppen der Enzymmoleküle gesucht.

2. Unabhängigkeit von Begleitstoffen.

Die Assoziationen des Invertins mit den begleitenden Fremdkörpern sind belanglos für die quantitativen Verhältnisse der Invertinwirkung. Dieser Satz ist die Grundlage der quantitativen Analyse, mit der nach dem Vorbild der Peroxydase[3]) das Invertin auf seinem Wege von der lebenden Hefe (Invertinzeitwert z. B. 340) bis zu seiner 1600fachen Konzentration in den letzten Präparaten (Zeitwerte 0,3

[3] Fermentforschung Bd. 4, S. 310 [1920/21].

[4] E. Abderhalden und H. Handovsky, Fermentforschung Bd. 4, S. 310 [1920/21], und zwar S. 326.

[5] Das Fermentproblem, Verlag v. Th. Steinkopff [1922].

[6] Das Fermentproblem, S. 177 u. 233 [1922].

[7] Das Fermentproblem, S. 156 [1922].

[8] L. Michaelis und M. L. Menten, Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913].

[1]) Chemie der Enzyme, 2. Aufl., 1. Teil, Verlag J. F. Bergmann [1920].

[2]) H. v. Euler und O. Svanberg, Fermentforschung Bd. 3, S. 330 [1920]; Bd. 4, S. 20, 60 u. 142 [1920/21].

[3]) R. Willstätter und A. Stoll, Liebigs Ann. der Chem. Bd. 416, S. 21 [1917/18].

bis 0,2) verfolgt wird. Der Satz von der quantitativen Erhaltung der enzymatischen Wirkung ist aber auch belegt und bestätigt durch viele Hunderte von Analysen, mit denen dieser lange Weg widerspruchslos kontrolliert wird. Die Invertinwirkung bleibt quantitativ erhalten von der Reaktion an, die der lebende Pilz auf den Rohrzucker ausübt bis zu dessen Hydrolyse durch das von Kohlehydraten, Eiweißstoffen, Phosphorverbindungen völlig befreite Invertinpräparat. Natürlich gibt es auf diesem Wege viele Verluste, so daß z. B. nur ¹/₆ des Hefeenzyms rein gewonnen wird. Aber das sind Verluste von derselben Art, wie wenn ein Alkaloid, Glucosid oder Farbstoff aus kompliziertem Ausgangsmaterial isoliert wird.

[49] Findet man bei der Autolyse der Hefe mehr als 100% ihres Invertins in dem Hefesaft, dann ist die Erscheinung von ganz besonderen Bedingungen der enzymatischen Hefeauflösung abhängig und ist als Neubildung des Invertins verstanden worden. Findet man im Autolysat weniger als 100%, dann ist der Rest in den Heferückständen anzutreffen. Ist die Ausbeute im Autolysat gering, so wird erkannt, daß der spezifische Abbau der das Enzym abschließenden Membran unvollkommen war. Fällt man das Invertin aus einer Lösung z. B. mit Bleiacetat aus, so ist die Summe von Enzym in der Mutterlauge und in der Fällung gleich dem angewandten Enzym. Man kann zwar das Invertin nicht im Bleiniederschlag bestimmen, aber man findet es später, je nachdem man es besser oder weniger gut eluiert, zu 70 bis 90% in den Elutionen wieder.

Daher rechnet man bei der präparativen Arbeit, gleichviel in welchem Zustand und Reinheitsgrad das Enzym vorkommt, mit einem der Enzymmenge proportionalen, additiven Maße, dem Menge-Zeit-Quotienten[1].

Diese analytische Methodik ist mit Ansichten anderer Forscher über den Einfluß der Begleiter unvereinbar, die besonders deutlich vor kurzem A. KIESEL[2] ausgesprochen hat: „Erstens wird der quantitative Vergleich verschiedener Objekte und Individuen in bezug auf Fermentgehalt unrichtig, da wir nur auf Grund der fermentativen Wirkung eine Vorstellung über die Quantität des Ferments bekommen, die fermentative Wirkung aber von den Beimengungen höchst beeinflußt wird. Zweitens können die anwesenden fremdartigen Körper der Tätigkeit des Ferments einer zum Angriff dargebotenen Substanz gegenüber hinderlich, einer anderen gegenüber aber ohne Einfluß oder sogar behilflich sein."

Unsere entgegengesetzte Anschauung bot die Grundlage für die Methode der Zeitwertquotienten[3] zur Untersuchung [50] der Enzymspezifität. Um zu erfahren, ob die Hefe für die Spaltung verschiedener Substrate ein und dasselbe Enzym anwendet oder eine Mehrzahl von Enzymen zur Verfügung stellt, z. B. für Maltose und α-Methylglucosid, oder für α-Methyl- und α-Phenylglucosid, oder für Saccharose

[1] I. Abhandlung, S. 8.
[2] Diese Zs. Bd. 118, S. 284 [1921/22].
[3] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 199 [1921]; R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, ebenda, Bd. 115, S. 180 [1921]; R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI, ebenda, Bd. 117, S. 172 [1921].

und Raffinose, und um analog Emulsin auf Zahl und Spezifität seiner Enzymkomponenten zu prüfen, wurden die Quotienten der verschiedenen enzymatischen Wirkungen verfolgt. Beispielsweise ergibt der Quotient der Zeitwerte für α-Methylglucosid : Maltosespaltung keine konstante Zahl. Er bewegt sich bei verschiedenen Brauereihefen zwischen 7,7 und 0,9 und fällt noch tiefer bei Brennereihefen. Daraus geht hervor, daß die Hefe für diese Hydrolysen verschiedene Enzyme ausbildet.

Die Bestimmung dieser Zeitwertquotienten widerlegt Ansichten wie die angeführten von A. KIESEL. Es hat sich nämlich dabei das Verhältnis der Saccharase zur Raffinasewirkung in einer Anzahl von Präparaten der verschiedensten Reinheitsgrade genau konstant gezeigt. „Es ist bemerkenswert, wie konstant bei einer langen Reihe verschiedenartig ausgeführter Operationen, welche die Möglichkeit einer Fraktionierung bieten, das Verhältnis der beiden enzymatischen Wirkungen bleibt." Bei der Freilegung und dem Herauslösen aus der Hefe, „bei der Entfernung der Eiweißkörper aus wäßrig-acetoniger Lösung, die nicht ohne Verlust von Enzym stattzufinden pflegt, bei der Adsorption mit verschiedenen Mitteln, bei der Elution aus den Adsorbaten, beim Fällen mit organischen Lösungsmitteln, bei den öfters unter beträchtlichem Enzymverlust ausgeführten Vornahmen der Dialyse und des Eindampfens ist keine Anreicherung einer Enzymkomponente eingetreten[1]."

Die Begleitstoffe vermögen die Invertinwirkung in quantitativer Beziehung also nicht zu beeinflussen, weder die Kinetik, noch die Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration, noch die Beziehung zur Rohrzuckerkonzentration. Mit unseren reinsten Invertinpräparaten bestimmten wir[2] die [51] Dissoziationskonstante der Saccharase-Saccharose-Verbindung bei 30° gleich 0,020 in genauer Übereinstimmung mit H. v. EULER und J. LAURIN[1]). Im zweiten Abschnitt des folgenden experimentellen Teils wird ferner die von L. MICHAELIS in der angeführten Arbeit „Die Kinetik der Invertinwirkung" theoretisch abgeleitete Reaktionsgleichung an unseren reinen Präparaten geprüft und bei der Mehrzahl von ihnen (über eine Ausnahme vgl. Tab. 13, S. 70) ebenso geltend gefunden wie bei den Gemischen des Enzyms mit 1000mal mehr Begleitstoffen. Dabei wird beobachtet, daß die Invertinkinetik, die nach L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN[2]) von der Wasserstoffzahl unabhängig sein soll, von dieser im Gegenteil stark beeinflußt wird. Die für den monomolekularen Verlauf der Rohrzuckerspaltung berechnete Konstante finden wir in Übereinstimmung mit L. MICHAELIS bei optimalem p_H ansteigend, aber fallend in der Nähe des Neutralpunktes, ohne daß etwa während der Bestimmung Enzym durch Zersetzung verloren geht.

3. Unabhängigkeit von der Verteilung.

Die Invertinwirkung ist auch unabhängig von dem gesamten Kolloidsystem, in welches das Enzym eingebettet ist, von der Teilchengröße, von der Verteilung. Auf

[1] a. a. O., Bd. 115, S. 101 [1921].
[2] Die Versuche werden in einer späteren Mitteilung angeführt.
[1]) Diese Zs. Bd. 110, S. 55 [1920]. [2]) Biochem. Zs. Bd. 35, S. 386 [1911].

diesem, den Anschauungen von A. Fodor[1]) entgegenstehenden Satz beruhen, durch die Erfahrungen ihn bestätigend, die Adsorptionsmethoden zur Reinigung und Fraktionierung des Invertins. Aus den Invertinlösungen, z. B. den frisch dargestellten Autolysaten, kann man ohne Änderung des enzymatischen Wertes eine Menge kolloider Begleitstoffe, namentlich Eiweißkörper, mit Kaolin beseitigen oder noch mehr mit Bleiacetat ausfällen. Und ohne daß die enzymatische Leistung berührt wird, läßt sich das Invertin auf oberflächenaktiven Stoffen niederschlagen. Es wurde schon öfters bemerkt, daß die Adsorbate, z. B. das mit Tonerde gebildete, das Invertin unverändert wirksam enthalten. Aber wenn der Beweis auch für die praktische Anwendung des Adsorptionsverfahrens, das keinen Verlust [52] bedingen soll, genügt, so scheint er doch für den quantitativen Vergleich von gelöstem und adsorbiertem Invertin ohne strenge Geltung zu sein, da unter den Bedingungen der Bestimmung das Enzym vom Rohrzucker eluiert wird. Die Zerlegung des Adsorbates mittels der Rohrzuckerlösung ist aber nicht eine momentane, sondern sie hat sich als ein Zeitphänomen erwiesen[2]).

In den gleichzeitigen Arbeiten von J. M. Nelson und D. J. Hitchcock[3]) und von Willstätter und Kuhn[4]) wird unter Bedingungen, unter denen die Zuckerlösung das Invertinadsorbat nicht eluiert, der Wert von adsorbiertem und von gelöstem Invertin verglichen und übereinstimmend gefunden. Während Nelson und Hitchcock mit von gewissen Tierkohlesorten gebildeten, nicht eluierbaren Adsorbaten arbeiten, fanden wir, daß Tonerdeadsorbate zwar von Rohrzucker + Phosphat, indessen nicht von Rohrzucker + Natriumacetatpuffer zerlegt werden. Das Invertin wirkt aber unter diesen Umständen quantitativ wie in wäßrigem Medium.

Die quantitativ bestehende Unabhängigkeit von der Verteilung erhellt auch aus einem einmal in anderem Zusammenhang erwähnten Versuche[5]) der teilweisen Zerlegung von Invertin-Tonerdeadsorbat durch Rohrzucker + primäres Phosphat in sehr geringer Konzentration. In diesem Falle fand man nach 5½stündiger Einwirkung bei 15,5° 29% des Invertins in Lösung, 71% im Aluminiumhydroxyd.

Die Rohrzuckerhydrolyse in der Hefe selbst nach J. O'Sullivan[6]), H. v. Euler[7]), R. Willstätter und F. Racke[8]) spricht [53] gleichfalls gegen irgendwelchen Einfluß der Verteilung. Invertin in der Zelle wirkt wie Invertin in Wasser. Es kann hier außer Betracht bleiben, ob die Auflösung mit oder ohne enzymatische Freilegung erfolgt;

[1]) Das Fermentproblem 1922.

[2]) O. Meyerhof, Pflügers Arch. Bd. 157, S. 251 [1914] und zwar S. 271; L. Michaelis, Biochem. Zs. Bd. 115, S. 268 [1921], mitbearbeitet von T. Rothstein; R. Willstätter und R. Kuhn, Zs. physiol. Chem. Bd. 116, S. 53 [1921].

[3]) J. Am. Chem. Soc. Bd. 43, S. 1956 [1921].

[4]) Zs. physiol. Chem. Bd. 116, S. 53 [1921] und zwar S. 56.

[5]) a. a. O., S. 60.

[6]) Journ. Chem. Soc. Bd. 61, S. 593 u. 926 [1892].

[7]) H. v. Euler und S. Kullberg, Zs. physiol. Chem. Bd. 71, S. 14 und Bd. 73, S. 85 [1911]; H. v. Euler und O. Svanberg, ebenda Bd. 105, S. 187 und Bd. 106, S. 201 [1919]; H. v. Euler und R. Blix, ebenda, Bd. 105, S. 83 [1919].

[8]) I. Abh., Kap. A, 3. Abschn.

es kommt nur darauf an, daß es beim Zerreiben wie bei rascher Autolyse gelingt, etwa gleich viel Invertin zu finden wie bei direkter Bestimmung in Frischhefe. Für diesen Vergleich diene zur Ergänzung der angeführten Kapitel der I. Abhandlung ein noch nicht veröffentlichtes Beispiel:

Frische Hefe, je 50 g, wurde $^3/_4$ Stunden mit dem gleichen Gewicht Seesand zerrieben, dann mit der doppelten Menge Wasser versetzt und 4 Tage autolysiert.

1. Die frische Hefe	M.Z.Q. der Hefe 0,55	100 %.
2. Autolysiert mit Toluol bei saurer Reaktion	M.Z.Q. der Lösung 0,57	100 %.
3. Autolysiert mit Essigester + Toluol unter Zus. von Ammonphosphat	M.Z.Q. der Lösung 0,55	100 %.
4. Autolysiert mit Essigester	M.Z.Q. der Lösung 0,26	47 %.
	M.Z.Q. der Hefereste 0,275	50 %.

Auf den enzymatischen Wert des Invertins üben auch Änderungen der Reaktion des Mediums keinen Einfluß aus, wenn für die Bestimmungen vergleichbare Bedingungen wieder hergestellt werden. Die aus den Peptidspaltungen in den angeführten Arbeiten von E. Abderhalden und A. Fodor gezogene Schlußfolgerung, daß elektrische Umladungen durch Dispersitätsänderungen die enzymatische Aktivität beeinflussen, trifft bei der Saccharase nicht zu. Die Möglichkeit, chemische Reagenzien im Gange der Invertindarstellung anzuwenden, beruht darauf, daß die quantitativen Verhältnisse dadurch nicht berührt werden. Dies ist der Fall, solange die Beständigkeitsgrenzen des Enzyms beachtet werden. Die Invertinlösungen können z. B. bei der Ausfällung der Phosphorsäure vorübergehend alkalisch oder in anderen Fällen sauer sein, z. B. bei der Adsorption durch Kaolin. Das Invertin wirkt negativ oder positiv geladen gleich, sei es also in dem geringen Reinheitsgrad der Autolysate rein anodisch wandernd oder in dem höheren der Elutionen unter den Aciditätsverhältnissen der Bestimmung überwiegend kathodisch wandernd.

[54] 4. Die Einflüsse der Begleitstoffe.

Die Erscheinungen der Enzymspezifität und die Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes haben die Auffassung gestützt, daß die Enzymwirkung auf einer chemischen Reaktion zwischen der aktiven Gruppe der Saccharase und dem Rohrzucker beruht. Die mit dem Enzym assoziierten fremden Stoffe, die auf seine Wirkung keinen Einfluß haben, sind bestimmend für sein Kolloidverhalten, für gewisse physikalische Eigenschaften und für ein falsches Bild seiner chemischen Eigenschaften.

Unreines Invertin verhält sich nicht einfach wie ein Gemisch von reinem Invertin mit den Fremdstoffen. Es scheint mit den letzteren auf ähnliche Weise wie in den Adsorbaten verankert zu sein.

Die mit ihm assoziierten, zwar amphoteren, doch überwiegend elektronegativen Proteinsubstanzen der Hefeautolysate machen das Invertin sauer und bewirken, daß es von negativen Adsorbentien wie Kaolin nicht oder nur wenig aufgenommen wird. Adsorbierbar durch Kaolin ist das einmal mit Tonerde oder durch Bleifällung gereinigte Invertin. Andererseits bedingen die Begleitstoffe die im Kapitel B und C

beschriebene Fallbarkeit des Invertins mit den Bleiniederschlägen. Die Autolysate geben mit Bleiacetat starke Fällungen, die Eiweißkörper und Nucleinsubstanzen enthalten. Die Bleifällungen aus frisch dargestellten Hefeauszügen adsorbieren kein Invertin, die aus gealterten enthalten es quantitativ. Reines Invertin gibt aber mit Bleiacetat überhaupt keine Fällung.

Noch ausgesprochener ist der Einfluß der Begleitstoffe auf die Zerlegung der Adsorbate von Invertin in Aluminiumhydroxyd und in den Bleifällungen. Während die aus den Autolysaten gewonnenen Tonerdeadsorbate mit verdünntem Ammoniak glatt zerlegt werden, läßt sich das durch wiederholte Adsorptionsvornahmen gereinigte Invertin auf diese Weise nicht mehr aus den Adsorbaten in Freiheit setzen. Auch die invertinhaltigen Bleifällungen geben in vielen Fällen das Enzym schon an verdünnte Alkalien ab, in anderen Fällen, durch den Einfluß des Systems von Koadsorbentien und Koeluentien nicht an Ammoniak, nur an alkalisches Phosphat, Arsenat oder Citrat.

[55] Mit dem Adsorptionsverhalten geht die elektrische Überführbarkeit des Invertins Hand in Hand, die ebenfalls durch die assoziierten Körper beeinflußt wird. Für die Autolysate, auch gealterte, gilt die Angabe von L. MICHAELIS[1], daß Invertin in wäßriger und in angesäuerter Lösung rein anodisch wandert. Aber die Schlußfolgerung, daß es eine Säure sei, wird durch Versuche mit dem reinen Enzym hinfällig. Schon die einmalige Reinigung mit Aluminiumhydroxyd genügt, um ihm den elektronegativen Charakter zu nehmen. Und Invertin vom Zeitwert 1, das zweimal mit Tonerde und dazwischen mit Kaolin gereinigte Präparat der II. Abhandlung, sowie ein ähnlich reines Präparat dieser Arbeit war vollends amphoter und schon bei p_H 6 überwiegend kathodisch wandernd (siehe II, Abschn. 4).

Auch die Temperaturempfindlichkeit unterliegt dem Einfluß der Begleitstoffe, die dem Invertin Schutz gewähren. Mit steigender Reinheit nimmt sie zu. Zur Unterscheidung von Enzymen sind daher solche Bestimmungen, die oft dafür angeführt werden, nicht brauchbar. Auch das Temperaturoptimum kann nicht zur Kennzeichnung eines Enzyms dienen, es hat keinen einfachen Sinn und ist nicht konstant.

Unser Neutralautolysat wies die nämliche Temperaturempfindlichkeit auf, die H. v. EULER und J. LAURIN[2] übereinstimmend bei Hefe selbst und Hefeauszügen beobachtet haben. Invertin vom Zeitwert 3,3 bis 1,3 wurde unter denselben Bedingungen geprüft bei Gegenwart von Phosphat und optimalem p_H. Während das Autolysat bei $57^1/_2°$ in 1 Stunde 32% einbüßt, wird das Invertinpräparat zu 89% zerstört, bei 52° verliert es 43% an Wirkung. Das ist fast der nämliche Unterschied wie zwischen Hefesaccharase und Darmsaccharase nach H. v. EULER und K. MYRBÄCK[3]. Viel größer als bei Gegenwart von Phosphat ist die Zersetzlichkeit des Invertins beim Erwärmen in reinem Wasser. Für die Zerstörung des Invertins durch

[1] Biochem. Zs. Bd. 16, S. 81 [1909]. [2] Zs. physiol. Chemie Bd. 108, S. 64 [1919/20].
[3] Zs. physiol. Chem. Bd. 115, S. 68 [1921].

organische Lösungsmittel gilt Ähnliches. [56] In weiteren Beobachtungen hat sich die Angabe[1] bestätigt, „daß die schädigende Wirkung von Alkohol und Aceton vom Reinheitsgrad des Invertins in hohem Grade abhangt. Die Begleitstoffe in den Hefeauszügen üben auch hier ihre schützende Wirkung aus".

Für das optische Drehungsvermögen des Invertins täuschen die Beimischungen willkürliche Werte vor. Die zwei Praparate von größter Konzentration, *m* (Tab. 8) aus Bleifällung, *l* aus Restlösung, sind optisch-aktiv und zwar entgegengesetzt drehend, im Drehungsvermögen genau übereinstimmend. Die Werte sind zufallig und belanglos.

Präp. *l* in 0,225proz. Lösung; 2 dm, 18°, α = [illegible] 0,13°;

$[\alpha]_D^{18}$ = [illegible] 29°.

Präp. *m* in 0,172proz. Losung; 2 dm, 20°, α = [illegible] 0,10°;

$[\alpha]_D^{20}$ = [illegible] 29°.

Endlich beruht das gesamte Fallungsverhalten, die Fallung von Invertin selbst durch Alkohol und Aceton und die recht unregelmaßige Bildung von Niederschlagen, die mehr oder weniger Invertin einschließen können, durch Eiweiß- oder Alkaloidreagenzien (Uranylacetat, Bleiacetat, Quecksilberchlorid, Pikrinsäure u. a.) nur auf der Beimischung von Fremdkörpern. Sie bieten wenig Interesse, weil sie wechseln. Eine dem Invertin selbst zukommende Fällungsreaktion ist nicht bekannt.

5. Enzymzerstörung.

Die Erfahrungssätze von der Konstanz der Enzymwirkung gelten für das Invertin bis zu hohem Reinheitsgrade. Werden die Begleitstoffe mehr und mehr beseitigt, so erfolgt zwar nicht eine quantitative Änderung der Wirkung, aber Gefährdung der Wirksamkeit, Verminderung der Beständigkeit. Das System von Kolloiden bestimmt nicht, wie das Invertin wirkt, sondern hat Einfluß darauf, ob es wirksam bleibt. Ebenso wie ein an elektrischen Ladungen sehr armes Kolloid empfindlich ist, ähnlich erscheint das Invertin empfindlich, wenn die analytisch nachweisbaren Gruppen entfernt sind.

[57] Die durch kombinierte Anwendung der Bleifällung und der Tonerdeadsorption gereinigten Invertinlösungen leiden in vielen Fällen beim Abdampfen und beim Dialysieren. Für diese Erscheinung, von der die Tab. 10 einige Beispiele gab, sind zwei Deutungen möglich. Es kann sich um Zerstörung von einem Teil des Enzyms oder um Verschlechterung, verminderte Wirksamkeit des gesamten Enzyms handeln. Wir schließen aus den Erfahrungen, von denen die letzten Abschnitte berichteten, daß die Wirkung des Invertins durch seine Masse stöchiometrisch bedingt ist, daß sie in einem konstanten Verhältnis zu seiner aktiven Menge steht. Im Falle eines Rückganges gelingt es auch nicht, durch Beimischungen eine Steigerung herbeizuführen. Daher wird eine Abnahme um beispielsweise 20% gedeutet als Zerstörung von 20% des Enzyms.

Um die Zersetzung der Saccharase oder eines der ähnlichen Zuckerenzyme in ihrem Mechanismus zu erklären, sind zwei Annahmen in Betracht zu ziehen. Die wirksame

[1] I. Abh., S. 105.

Gruppe des Enzymmoleküls kann durch eine chemische Änderung inaktiviert werden. Es kann sich z. B. um eine innere Kondensation handeln, vergleichbar mit den unter Wasseraustritt erfolgenden Reaktionen zwischen einer Aldehydgruppe und einer Aminogruppe, oder einem Carboxyl und einer Aminogruppe.

Die zweite Möglichkeit wäre die Zerstörung des Enzyms in seiner Kolloidnatur durch Verlust seiner Aufladung, die eine Voraussetzung für die Beständigkeit des Soles bildet. Wären z. B. noch Proteine, die an elektrischen Ladungen reich sind, dem Enzym beigemengt, so würde die Aufladung des Soles weniger leicht verloren gehen.

Wenn man die Zerstörung der Zuckerenzyme überblickt, sei es durch Einwirkung von Lösungsmitteln, durch Säuren, durch Alkalien, durch höhere Temperatur oder auch nur beim Stehen der reineren Lösungen in destilliertem Wasser von p_H 6,0 bis 6,5, so scheint es schwer möglich, sie in den Rahmen einer einzigen von diesen zwei Erklärungsweisen zu zwängen und die beiden zu trennen.

Am verschiedensten sind die unbeständige Maltase und [58] α-Methylglucosidase auf der einen, die beständige Saccharase und Raffinase auf der anderen Seite. Es gibt zwischen ihnen Übergänge wie die Melibiase, die dem Invertin zwar bis zum Ende folgt, aber in den Präparaten allmählich zugrunde geht, rascher als Invertin[1].

Die Leichtzersetzlichkeit der Maltase ist nicht gut so zu verstehen, daß ihr kolloider Zustand leidet. Denn sie geht in den Hefeauszügen, z. B. in den Neutralautolysaten, zugrunde, während sie von einer großen Menge von kolloiden Schutzstoffen begleitet ist. Auch stimmt sie in den Adsorptionserscheinungen und im Verhalten bei den Elutionen so weitgehend mit Saccharase überein[2], daß die kolloiden Träger in diesen Enzymmolekülen nicht grundverschieden sein können. Es scheint eher, daß die wirksamen Gruppen von Maltase und Saccharase erheblich verschieden sind.

Wenn man andererseits die Zerstörung der Saccharase in den reineren Lösungen auf eine innere Auslöschung ihrer chemisch wirksamen Gruppen zurückzuführen sucht, so ist zu berücksichtigen, daß die Empfindlichkeit des Enzyms erst spät im Laufe der Reinigung in Erscheinung tritt und zwar dann in der Nähe des isoelektrischen Punktes. Sie wurde in älteren Arbeiten gar nicht beobachtet. Der Enzymverlust pflegt nach einer gewissen Abnahme zum Stillstand zu kommen. Auch gibt es Fälle, in denen Lösungen über Erwarten beständig sind.

Im experimentellen Teil (Abschn. 5) wird gezeigt, daß die sehr zersetzlichen Invertinlösungen durch Zusätze von verschiedener Art stabilisiert werden. Diese Wirkung kommt Elektrolyten zu, z. B. Chlorcalcium. Ferner wirkt Hefegummi als günstiges Schutzkolloid. Auch Glycerin ist für die Stabilisierung der Saccharase geeignet. Zwischen dem Enzym und dem Glycerin gibt es eine spezifische Beziehung. Die enzymatische Rohrzuckerspaltung wird stark gehemmt durch Glycerin,

[1] R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921], und zwar S. 183.
[2] R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 116, S. 53 [1921] und zwar S. 62 u. 63.

[59] das nach L. MICHAELIS und H. PECHSTEIN[1] die Zerfallsgeschwindigkeit der Rohrzucker-Saccharase-Verbindung herabsetzt. Auch wird die Eluierbarkeit der Saccharase aus Adsorbaten durch minimale Mengen von Glycerin begünstigt[2]. Abgesehen von dem besonderen Falle des Glycerins dürfte das Invertin durch solche Zusätze haltbar gemacht sein, die auch sonst geeignet sind, Kolloide zu stabilisieren.

Die Erklärung der Invertinzerstörung soll berücksichtigen, daß Saccharase und Raffinase in konstantem Verhältnis der Zeitwerte durch alle Phasen der Reinigung zusammen bleiben und daß sie beim langsamen Verderben der Invertinpräparate im Laufe einer längeren Aufbewahrungszeit auch in konstantem Verhältnis zugrunde gehen[3]. Wenn jedem der beiden Enzyme eine besondere aktive Gruppe eigen ist und wenn die Zerstörung nicht an einem kolloiden Träger dieser Gruppe, sondern in ihr selbst einsetzt, dann müssen die wirksamen Gruppen von Saccharase und Raffinase äußerst ähnlich sein. Dieser Annahme steht nichts im Wege, denn die Raffinase wirkt auf einen Saccharoserest, der nur nicht frei existiert, sondern mit Galaktose verbunden ist. Das Verhalten des Saccharase-Raffinase-Gemisches würde indessen auch gut zu der Annahme stimmen, daß es die Zerstörung des kolloiden Zustandes ist, wodurch die Aktivität aufgehoben wird.

Die Gesamtheit der Erscheinungen von Zerstörung der Zuckerenzyme in den an Begleitstoffen verarmten Lösungen und von Stabilisierung ist schwer allein auf die Veränderung der aktiven Gruppen oder allein auf den Verlust der Aufladung zurückzuführen, wenn auch nicht bezweifelt wird, daß jede dieser beiden Ursachen allein für Fälle von Enzymzerstörung verantwortlich sein kann. Aus dem Verhalten der reineren Invertinlösungen ist vielmehr zu schließen, daß die Auslöschung der aktiven Enzymgruppe und der Verlust der Kolloidnatur zusammenhängen und sich gegenseitig bedingen. Das [60] Verderben des Enzyms besteht also nach unserer Auffassung in der Vernichtung seiner aktiven Gruppe, womit der Verlust der die Beständigkeit des Soles bedingenden Aufladung Hand in Hand geht.

Der Ladungsausgleich erfolgt nach dieser Annahme durch eine chemische Reaktion im Enzymmolekül, stöchiometrisch wie die Entladung bei Eiweißkörpern stöchiometrisch ist, die dabei Ausflockung erleiden. Die Verhütung der die wirksame Gruppe inaktivierenden Reaktion kann durch die lockerste Assoziation des Enzyms mit den stabilisierend wirkenden Begleitern oder Zusätzen erfolgen. Vielleicht ist sie mit der Stabilisierung von Acrolein nach den Untersuchungen von CH. MOUREU[1]) zu vergleichen, die durch geringe Mengen gewisser Phenole erfolgt. Für eine Assoziation der Stabilisatoren kommt nicht nur, wie vielleicht beim Glycerin, die wirksame Gruppe des Enzyms in Betracht, sondern auch eine andere, die imstande ist, die spezifische auszulöschen.

[1] L. MICHAELIS und M. L. MENTEN, Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913]; L. MICHAELIS und H. PECHSTEIN, Biochem. Zs. Bd. 60, S. 79 [1914].

[2] Diese Zs. Bd. 116, S. 53 [1921], und zwar S. 64ff.

[3] Diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921], und zwar S. 190f.

[1]) CH. MOUREU, CH. DUFRAISSE, P. ROBIN und J. POUGNET, C. R. Bd. 170, S. 26 [1920].

II. Experimenteller Teil.

1. Optimale Wasserstoffzahl der Invertinwirkung.

Invertin hat in reinerem Zustand bei der nämlichen Wasserstoffionenkonzentration optimale Wirkung wie das in den Autolysaten enthaltene. Sie liegt zwischen 4,0 bis 5,0. Die in der Tab. 11 angeführten Bestimmungen sind mit dem Präparat n_1 (Tab. 7) ausgeführt, dessen Zeitwert 0,65 betrug (nach dem Eindampfen der Lösung vom Zeitwert 0,50). Von der eingeengten Lösung mußten für die Versuche zwei Proben entnommen und 25fach verdünnt werden; da ihre Wirksamkeit bei optimalem p_H etwas ungleich war, sind die benützten Lösungen (1 und 2 in der Tabelle) für die Messungen und Berechnungen besonders bezeichnet worden. Die Wasserstoffzahl wurde mit den Standardlösungen nach S. P. L. SÖRENSEN, wovon man 30 ccm mit dem Enzym auf 100 ccm brachte, bei einem Gehalt von 4,75% Rohrzucker eingestellt und elektrometrisch kontrolliert.

[61] Als Maß für die Inversionsgeschwindigkeit dienen die für die Zeit $t = 0$ extrapolierten Konstanten der monomolekularen Reaktion. In der vorletzten Spalte der Tabelle ist nach dem Vorbild von L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN[1] der bei einer bestimmten Wasserstoffzahl wirksame Anteil des Enzyms φ mit der bei optimaler Acidität ($p_H = 4,63$) bestimmbaren Menge Φ verglichen. In der letzten Spalte werden die Dissoziationsreste einer Säure mit der Dissoziationskonstanten $1,65 \cdot 10^{-7}$ angeführt, zu denen die beobachteten Werte von φ/Φ gut stimmen. Sie gelten nach L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN[2] als die wirksamen Dissoziationsreste der Rohrzucker-Saccharase-Verbindung, die als Säure aufgefaßt werden soll.

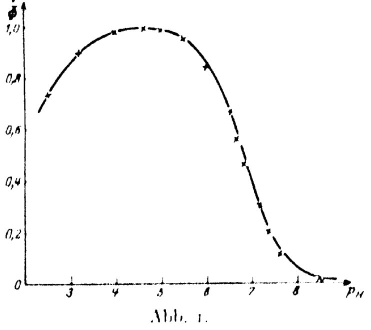


Abb. 1.

Charakteristischer als das flach verlaufende p_H-Optimum ist die Wasserstoffzahl, bei der das Enzym 50% der maximalen Wirkung aufweist. Bei dem gereinigten Invertin beträgt sie etwa $1,7 \cdot 10^{-7}$ in Übereinstimmung mit den ursprünglichen Messungen an Hefeauszügen von L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN und wohl innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmend mit der neuerdings angegebenen Zahl $3 \cdot 10^{-7}$.

[62] Tabelle 11. Wirkungsoptimum des gereinigten Invertins.

Enzymlösung	p_H (Millivolt gegen gesätt. Kalomelelektr.)	Zeit (Minuten)	Drehung (Grad)	Spaltung (%)	$\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x}$	φ/Φ gefunden	φ/Φ berechnet
1	2,5	0,0	5,05	0,0	83	0,71	
	(nicht gem.)	15,6	3,22	27,6	90		
		28,0	1,97	46,5	97		
		49,0	0,50	68,6	103		

[1] Biochem. Zs. Bd. 35, S. 386 [1911]. [2] Biochem. Zs. Bd. 110, S. 217 [1920].

Tabelle 11 (Fortsetzung).

Enzymlösung	p_H (Millivolt gegen gesätt. Kalomelelektr.)	Zeit (Minuten)	Drehung (Grad)	Spaltung (%)	$10^4 \cdot \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$	$\eta \cdot \Phi$ gefunden	$\eta \cdot \Phi$ berechnet
1	3,2	0,0	5,05	0,0	102	0,99	—
	(nicht gem.)	30,0	1,20	58,0	126		
		46,0	-0,04	76,8	138		
11	4,00	0,0	5,05	0,0	110	0,98	—
	(481,3; 20°)	21,3	1,88	47,8	128		
		34,3	0,65	66,3	138		
		47,0	0,21	79,4	146		
1	4,63	0,0	5,05	0,0	112	0,99	0,99
	(517,5; 20°)	19,0	2,16	43,5	130		
		32,0	0,75	64,9	142		
		41,8	0,05	76,9	152		
2	4,63	0,0	5,05	0,0	127	0,99	0,99
	(517,5; 20°)	17,0	2,21	42,3	141		
		28,2	0,92	62,4	151		
		42,0	-0,15	78,5	159		
1	5,00	0,0	5,05	0,0	111	0,98	0,985
	(530,5; 19°)	15,0	2,75	34,8	124		
		30,0	0,99	61,2	137		
		47,0	0,25	80,0	149		
1	5,48	0,0	5,05	0,0	108	0,95	0,95
	(500,5; 19°)	15,0	2,72	35,1	125		
		26,0	1,33	56,1	138		
		35,0	0,43	66,7	148		
2	5,90	0,0	5,05	0,0	108	0,84	0,86
	(506,3; 19°)	15,0	2,85	33,2	117		
		25,1	1,71	50,3	121		
[63]		40,0	0,39	70,3	132		
2	6,40	0,0	5,05	0,0	87	0,67	0,66
	(624,5; 19°)	15,0	3,24	27,3	93		
		30,0	1,78	49,3	99		
		45,0	0,06	65,7	103		
2	6,65	0,0	5,05	0,0	72	0,56	0,58
	(635; 18,5°)	24,1	2,92	32,1	70		
		43,0	1,80	49,0	68		
		70,0	0,72	65,3	66		
1	6,80	0,0	5,05	0,0	52	0,46	0,49
	(644; 20°)	42,0	2,93	32,0	40		
		64,0	2,41	39,8	35		
		106,0	1,62	51,8	30		
2	7,15	0,0	5,05	0,0	38	0,30	0,30
	(664; 20°)	43,0	3,14	28,8	35		
		70,0	2,50	38,5	30		
		111,0	1,53	53,0	29		
2	7,35	0,0	5,05	0,0	26	0,20	0,21
	(677; 18°)	34,2	4,04	15,2	21		
		66,0	3,65	21,1	16		
		94,2	3,22	27,6	15		
1	7,66	0,0	5,05	0,0	12	0,11	0,13
	(680,5; 20°)	45,0	4,40	9,8	10		
		70,0	4,21	12,7	8		
		118,5	3,90	17,4	7		
1	8,5	0,0	5,05	0,0	1,3	0,01	0,02
	(nicht gem.)	72,0	4,92	2,0	1,3		
		152,0	4,75	4,5	1,3		

2. Kinetik der Rohrzuckerspaltung durch gereinigtes Invertin.

Wechselnde Kinetik. Obwohl durch Einhaltung konstanter Wasserstoffionenkonzentration und Berücksichtigung der Mutarotation der Glucose bekannte Fehlerquellen vermieden [64] werden, sind die Resultate hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der enzymatischen Rohrzuckerspaltung[1] widersprechend. C. S. Hudson findet mit dem Invertin der Hefeautolysate genau monomolekularen Verlauf, wie sich auch die älteren von C. O'Sullivan und F. W. Tompson mitgeteilten Versuche, die von R. Willstätter und F. Racke[2] der Invertinbestimmung zugrunde gelegt wurden, der Theorie für eine monomolekulare Reaktion annähern. Dem stehen die Beobachtungen anderer Forscher entgegen, denen zufolge die Reaktionskonstanten erster Ordnung deutlich ansteigen. L. Michaelis und H. Davidsohn haben den letzteren Fall als normal angesehen und L. Michaelis und M. L. Menten konnten nach dem Vorgang von V. Henri mit Hilfe der experimentell bestimmten Affinitätskonstanten der Saccharase zu Rohrzucker, Fructose und Glucose theoretisch eine Reaktionsgleichung der enzymatischen Rohrzuckerhydrolyse ableiten, die mit ihren kinetischen Messungen in exakter Übereinstimmung stand. Diese Gleichung besagt, daß das Produkt Enzymkonzentration · Zeit proportional ist der Summe einer logarithmischen und einer linearen Funktion des Umsatzes. J. M. Nelson und W. C. Vosburgh, die in 19 von 24 untersuchten Fällen mit noch unreinem Invertin die Reaktionskonstanten ebenfalls ansteigend fanden, versuchen abweichend von Michaelis den Mechanismus der Invertinwirkung durch Adsorptionsvorgänge zu deuten. Indessen dürfte diese Auffassung mit der Konstanz der von Michaelis berechneten und von uns bestimmten [65] Zahlen[1]), die ein Maß der Enzymmenge unabhängig von der Rohrzuckerkonzentration darstellen, unvereinbar sein.

Zu den Fällen, in denen die k-Werte anscheinend konstant sind, gehören auch 5 von den 24 Messungen von Nelson und Vosburgh, die allerdings nicht alle bei optimalem p_H ausgeführt sind. Hier und zumal bei fallendem k nehmen Michaelis sowie Nelson an, daß Enzymzerstörung mitspiele. Dieser Einwand ist indessen, wie im folgenden auf Grund der Beobachtungen von Tab. 13 und 11 gezeigt wird, nicht stichhaltig.

In anderen Fällen anscheinend monomolekularen Verlaufes wurde mit Rohrzuckerlösungen höherer Konzentration gearbeitet (O'Sullivan und Tompson, Hudson), für welche die Theorie von Michaelis keine Geltung mehr beansprucht.

[1] C. O'Sullivan und F. W. Tompson, Jl. Chem. Soc. Bd. [illegible], S. [illegible] [1890]; Duclaux, Traité de Microbiologie, 1899, Bd. II; A. J. Brown, Proceed. Chem. Soc. Bd. [illegible], S. 41 [1902]; V. Henri, Diese Zs. Bd. 39, S. 194 [1902]. Lois générales de l'action des diastases. Thèse, Paris 1903, S. 77ff.; C. R. Bd. 135, S. 916 [1902]; S. P. L. Sörensen, Biochem. Zs. Bd. 21, S. 131 [1909], und zwar S. 159ff.; C. S. Hudson, Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 30, S. 1160 u. 1564 [1908]; L. Michaelis und H. Davidsohn, Biochem. Zs. Bd. 35, S. 386 [1911]; L. Michaelis und M. L. Menten, Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913]; J. M. Nelson und W. C. Vosburgh, Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 39, S. 790 [1917]; W. C. Vosburgh, Dissertation, Columbia University 1919.

[2] I. Abh., S. 9.

[1]) Vgl. im theoret. Teil den Schluß des Abschnittes „Unabhängigkeit von den Begleitstoffen".

Um die Kinetik mit reinerem Invertin zu prüfen, führten wir mit den Präparaten l_2, n_1 und m von den Zeitwerten 0,8 bis 0,4 in verschiedenen Konzentrationen (1:12½) Messungen aus, die in der Tab. 12 zusammengestellt sind. Hier ergeben sich durchwegs ansteigende k-Werte, die recht genau durch die Theorie von L. MICHAELIS erklärt werden. Diesen Fällen stehen aber die Beobachtungen gegenüber mit dem Präparate l vom Zeitwert 0,34 in Konzentrationen, die sich wie 1:20 verhalten. Obwohl es sich um dieselbe Hefe und dasselbe Autolysat wie beim Präparat m, um den nämlichen Reinigungsgang und sogar die gleiche Fraktionierung wie beim Präparat n_1 handelt, ist der Reaktionsverlauf hier abweichend, die Rohrzuckerhydrolyse nämlich genau monomolekular. Wäre im Beispiel 1 der Tab. 13 diese Konstanz nur zufällig durch Enzymzerstörung bedingt, so müßte bei der 20fach längeren Versuchsdauer im 2. Beispiel die Konstante sinken, was nicht der Fall ist. Überdies wird im folgenden durch direkte Kontrolle die Annahme von Enzymzerstörung ausgeschlossen.

Die Divergenz der Beobachtungen an Hefeauszügen wiederholt sich also bei dem gereinigten Invertin. Dabei handelt es [66] sich nicht um einen einzelnen Ausnahmefall. Vielmehr wird die Gleichung von MICHAELIS, wenn man die Wasserstoffionenkonzentration variiert, zu einem Spezialfall. Der zeitliche Verlauf der Rohrzuckerhydrolyse ist nach den in der Tabelle 11 des 1. Abschnittes angeführten Versuchen in hohem Maße von der $[H^{\cdot}]$ abhängig.

In dieser Tabelle steigen die Werte von $\frac{10^4}{t}\log_{10}\frac{a}{a-x}$ bei optimalem p_H an, sie sind bei 6,7 etwa konstant, um bei geringerer Acidität deutlich zu fallen.

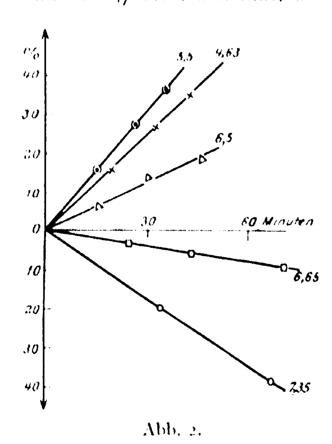


Abb. 2.

Auch für die von O'SULLIVAN und TOMPSON beobachtete Kinetik, die zwischen der monomolekularen und der von MICHAELIS geforderten liegt, gibt es unter den gereinigten Saccharaselösungen Beispiele. So berechnen wir nach der von den englischen Forschern mitgeteilten Kurve für ein Präparat vom Zeitwert 1 Nulldrehungszeiten von 145, 153, 146, 141, 142, 143 und 142.

Die Frage der Invertinkinetik ist also nicht gelöst, wie man nach den großen Arbeiten, die vorliegen, annehmen konnte, sondern sie macht weitere Beobachtungen nötig, zu denen wir [67] durch Darstellung von noch reinerem Invertin beizutragen hoffen. Es wird zu prüfen sein, ob die Affinitäten des Invertins zum Substrat und zu den Spaltungsprodukten von der Wasserstoffionenkonzentration wesentlich beeinflußt werden. Da aber auch bei konstantem p_H, nämlich bei optimalem, verschiedener Reaktionsverlauf vorkommt, so wird ferner zu untersuchen sein, was den Zustand des Invertins beeinflußt und ob der Fall vorkommt, daß die Summe der Affinitäten von Saccharase zu den beiden Spaltprodukten gleich der Affinität zur Saccharose ist.

Frage der Enzymzerstörung. HUDSON und PAINE[1] und besonders H. v. EULER und J. LAURIN[2] haben gezeigt, daß die Stabilität der Saccharase bei optimalem p_H am größten ist und daß die Temperaturempfindlichkeit zu beiden Seiten dieses Gebietes rasch zunimmt. Wir untersuchten deshalb, ob bei 30° und p_H = 6,8, wo die k-Werte in 106 Minuten von 52 auf 30 gefallen waren (vgl. Tab. 11), entsprechend einer scheinbaren Enzymzerstörung von 55%, unsere Enzymlösung an Aktivität einbüßte. Dies war keineswegs der Fall.

1. 5 ccm verdünnte Enzymlösung wurden sofort in die vorgewärmte Mischung von [illegible] ccm m/15 Phosphat + 50 ccm 0,5proz. Rohrzuckerlösung eingetragen und mit 30° warmem Wasser auf 100 ccm gebracht. Nach 5,5 und 10,2 Minuten beobachteten wir Drehungsabnahmen von 0,42 und 0,74°. Drehungsabnahme pro Minute = 0,0745 (p_H = [illegible]; [illegible] Millivolt bei 20°).

2. 5 ccm derselben Enzymlösung + 5 ccm m/15 Phosphat + 5 ccm Wasser wurden 100 Minuten auf 30° erhitzt und dann mit Rohrzucker + 25 ccm Phosphat gemischt. Drehungsabnahmen nach 5,0 und 10,0 Minuten 0,37 und 0,78°. Drehungsabnahme pro Minute = 0,0745 (p_H = [illegible]; [illegible] Millivolt bei 20°).

Dies sind ganz andere Versuchsbedingungen als bei den Angaben von S. P. L. SÖRENSEN über Abhängigkeit der Kinetik vom p_H. L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN hatten diese auf Enzymzerstörung zurückgeführt, die monomolekularen Verlauf vortäuschen kann. Das gilt für hohe Acidität und für hohe Temperaturen, 52° und p_H = 3,0 bei SÖRENSEN, p_H = 2,5 [68] und 25° bei MICHAELIS. Die späteren Arbeiten von MICHAELIS scheinen auf Grund der Versuche von SÖRENSEN bei p_H = 6,3 und 6,7 die Unabhängigkeit der Invertinwirkung vom p_H vorauszusetzen und nur Messungen der Anfangsgeschwindigkeiten zu enthalten.

Abhängigkeit vom Reinheitsgrad. Um zu prüfen, ob die Unreinheit der Enzymlösung im Wege stand, den Einfluß der Acidität auf die Kinetik zu finden, stellten wir zum Vergleich mit unseren Beobachtungen der Tab. 11 nach dem Verfahren von MICHAELIS, also durch Anreiben mit Sand und kurzes Ausziehen mit Chloroformwasser eine Invertinlösung dar. Mit dieser wurde der zeitliche Verlauf der Rohrzuckerspaltung bei p_H = 4,6 und 6,8 verglichen.

1. 10 ccm nicht dialysierte Invertinlösung auf 100 ccm; p_H = 4,6. Die Drehungsabnahmen von 3,07, 4,80 und 5,81°, die nach 13, 17 und 25,5 Minuten beobachtet wurden, entsprechen Reaktionskonstanten von 308, 335 und 368.

2. 15 ccm; p_H = 6,8. Aus den nach 5,0, 13,5 und 22 Minuten beobachteten Drehungsabnahmen von 1,56, 3,27 und 4,40 berechnen sich k-Werte von [illegible], 221 und 216.

Es steht also mit diesem Hefeauszug nicht anders als mit dem reineren Präparat. Die Wirkung des Enzyms ist nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ vom p_H abhängig.

Ausführung der Messungen. Die auf 30° vorgewärmte 0,5proz. Rohrzuckerlösung, die 2% NaH_2PO_4 enthält, wird mit der kalt abgemessenen Enzymlösung schnell vermischt und im Meßkolben mit 30° warmem Wasser aufs doppelte Volumen gebracht. Nach bestimmten Zeiten werden 20 ccm der Bestimmungslösung in 5 ccm 2 n Sodalösung eingetragen, wobei man die Zeit des halben Auslaufes notiert. Nach 15 bis 45 Minuten wird im 2 dm-Rohr polarisiert. Die angegebenen Drehungswinkel stellen das Mittel aus mindestens 6 Einzelablesungen dar, die vom Mittel nie mehr als ±0,02° differierten. Den Wert der Enddrehung berechnen wir durch Multiplikation der experimentell bestimmten Anfangsdrehung mit −0,313. Um eine Vorstellung von der Genauigkeit der präparativen Aktivitätsmessungen an Invertinlösungen mit verschiedener

[1] Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 32, S. 774 [1910]. [2] Diese Zs. Bd. 108, S. 64 [1919].

Kinetik zu geben, sind in der 4. Spalte der nachfolgenden Tab. 12 und 13 die Nulldrehungszeiten nach C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON verzeichnet. Zur Berechnung der Konstanten nach der Theorie von MICHAELIS (6. Spalte) sind die bei 25° ermittelten Affinitätskonstanten versuchsweise auf unsere Inversionstemperatur von 30° übertragen worden.

[69] Tabelle 12. Reaktionsverlauf in Übereinstimmung mit L. MICHAELIS.

I. Präp. f_2 v. Zeitw. 0,8, Inversion bei 29,98 ± 0,02°; Polarisation bei 20°.
II. Präp. n_1 v. Zeitw. 0,69, Inversion bei 30,00 ± 0,03°; Polarisation bei 19 bis 20°.
III. Präp. *m* v. Zeitw. 0,42, Inversion bei 30,00 ± 0,05°; Polarisation bei 20°.
IV. Dasselbe Präparat Inversion bei 29,95 bis 29,85°; Polarisation bei 19,5 bis 22°.

Nr.	Zeit (Minuten)	Drehung (Grad)	Spaltung (%)	Null-drehungszeit (Minuten)	$\frac{10^4}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$	Konstante nach MICHAELIS
I	0,0	5,04	0,0	—	—	—
	10,0	4,31	11,0	111	508	0,0944
	20,2	3,64	21,2	111	515	0,0928
	30,5	2,95	31,6	104	540	0,0925
	45,0	2,10	44,5	99	569	0,0948
	60,1	1,40	55,1	101	580	0,0926
	81,0	0,54	68,1	99	614	0,0922
	105,1	−0,14	78,4	97	633	0,0899
	135,1	−0,71	(87,0)	(95)	(655)	(0,0875)
						Mittel: 0,0927 ± 20 ± 2 %
II	0,0	5,05	0,0	—	—	—
	3,0	4,02	15,5	22,9	243	0,447
	6,1	3,10	29,4	22,6	248	0,437
	9,5	2,20	43,0	21,7	257	0,434
	13,2	1,25	57,3	21,3	280	0,444
	18,0	0,38	70,4	20,7	294	0,436
	28,2	−0,75	(87,5)	(19,2)	(319)	(0,423)
						Mittel: 0,441 ± 6 ± 1,5 %
III	0,0	5,05	0,0	—	—	—
	2,7	4,27	11,8	28,2	204	0,376
	5,2	3,60	22,2	27,6	210	0,378
	7,4	3,05	30,2	26,7	212	0,371
	9,6	2,55	37,7	25,9	214	0,367
	12,5	1,90	47,5	25,3	224	0,370
	15,2	1,33	56,1	25,2	235	0,375
	21,5	0,35	70,9	24,5	250	0,370
	34,5	−0,85	(89,0)	(21,9)	(278)	(0,365)
[70]						Mittel: 0,371 ± 6 ± 1,6 %
IV	0,0	5,05	0,0	—	—	—
	45,0	4,05	15,3	353	16,1	0,0296
	109,0	2,75	35,2	320	17,3	0,0296
	169,0	1,85	49,0	331	17,3	0,0281
	256,0	0,65	67,4	320	19,0	0,0285
	309,0	0,22	74,0	323	18,9	0,0275
						Mittel: 0,0286 ± 10 0,0286 ± 3,5 %

Tabelle 13. Monomolekularer Reaktionsverlauf.

I. Präp. *l* vom Zeitwert 0,34, Inversion bei 30,00 ± 0,02°; Polarisation bei 18°.

II. Dasselbe Präparat Inversion bei 30,00 ± 0,05°; Polarisation bei 21°.

Nr.	Zeit (Minuten)	Drehung (Grad)	Spaltung (%)	Nulldrehungszeit (Minuten)	$\frac{10^4}{t}\log_{10}\frac{a}{a-x}$
I	0,0	5,05	0,0	—	—
	1,9	4,44	9,2	25,4	222
	5,0	3,63	21,4	27,0	210
	7,0	3,10	29,4	26,0	217
	11,0	2,23	41,0	26,7	209
	15,3	1,50	53,6	26,8	218
	20,3	0,71	64,0	27,8	218
	32,0	−0,25	80,0	28,2	218
II	0	5,07	0,0	—	—
	25	4,66	6,2	490	11,2
	70	4,04	15,5	540	10,4
	120	3,43	24,6	553	10,2
	190	2,61	37,0	523	10,6
	325	1,47	54,0	563	10,4
	415	0,83	63,7	572	10,6
	540	0,13	74,2	563	10,9
	670	−0,40	82,0	553	11,1

[71] Tabelle 14.
Temperaturbeständigkeit der Saccharase im Autolysat und in gereinigter Lösung.

Nr.	Invertin	Reaktionsbedingungen	p_H	Temperatur (°)	Nulldrehungszeit (Minuten) vor dem Erhitzen	nach dem Erhitzen	Aktivitätsverlust (%)
1	Autolysat	1 ccm + 4 ccm 20proz. NaH_2PO_4-Lösung + 10 ccm H_2O	4,4	52 ± 0,5	33 34,5	34 34	0
2	Invertin aus dems. Autolys., Zeitw. 3,85 (1,3 in frisch. Zust.)	10 ccm 0,25 ‰ Lösg. + 4 ccm 20-proz. NaH_2PO_4-Lösg. + 1 ccm H_2O	4,4	52 ± 0,5	14 14	25 24	43
3	Autolysat wie 1	wie 1	4,4	57,5 ± 0,2	33 34,5	51 49	32
4	Invertin wie 2	wie 2, nur 5 ccm Enzym auf 15 ccm	4,4	57,5 ± 0,2	31 29	290 265	89
5	desgl.	nur 5 ccm ohne Phosphat auf 15 ccm	vor d. Erh. 6,28 (613; 18), nach d. Erh. 6,43 (621 18), Inversion bei 4,4	39,0 ± 0,1	31 29	48,5 48,5	39
6	desgl.	nur 5 ccm mit 2,6 ccm sek. + 7,4 ccm prim. m/15-Phosphat	6,40 Inversion bei 4,8	39,0 ± 0,1	31 29	33 32,5	8

[72] Die Proportionalität von Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit bestätigt sich, wie aus den Tab. 12 und 13 hervorgeht, unabhängig von der Kinetik der Invertinwirkung, in den Grenzen 1:12,5 und 1:20. Nach den Beispielen 1 und 2 der Tab. 13 ergeben die Mittelwerte der Reaktionskonstanten 10,7 und 216 das Verhältnis 20,2 anstatt 20,0.

Nach den Versuchen 3 und 4 der Tab. 12 ergeben die Mittelwerte der Reaktionskonstanten 285 und 3710 das Verhältnis 12,97 anstatt 12,50, während sich aus den Anfangsgeschwindigkeiten der Quotient 12,7 berechnet.

3. Temperaturempfindlichkeit.

Das Invertin des Hefeauszugs und das einer noch unvollkommen gereinigten Lösung wird in bezug auf Hitzezerstörung in der Tabelle 14 verglichen.

Nach den Beispielen 1 bis 4 macht der Enzymverlust des rohen Invertins bei 57,5° und des reineren bei 52° den gleichen Bruchteil aus. Das ist eine Schutzwirkung der Begleitstoffe und auf eine solche, die natürlich je nach Menge und Natur der Hefeinhaltsstoffe schwanken kann, sind auch Unterschiede in der Temperaturempfindlichkeit von Invertinvorkommnissen und Auszügen zurückzuführen. Die Unterschiede wurden bei einer Anzahl von Hefen und ihren Autolysaten von EULER und seinen Mitarbeitern[1] sehr gering befunden. Dies berechtigt indessen nicht, aus größeren Unterschieden der Temperaturbeständigkeit Schlüsse auf Verschiedenheit von Enzymen zu ziehen, besonders wenn es sich um Vorkommnisse einerseits in Pilzen, andererseits im wesentlich anderen Milieu tierischer Organe handelt. Anders ist es mit der Abhängigkeit vom p_H. In großem Reinheitsgrad zeigt das Invertin (vgl. Abschn. 1) dasselbe Wirkungsoptimum wie im Autolysat. Die von H. v. EULER und O. SVANBERG[2] festgestellte Verschiedenheit der [73] optimalen Wasserstoffzahl bei Hefe- und Darmsaccharase läßt sich daher nicht auf den Einfluß von Begleitstoffen zurückführen.

Neutralsalzeinfluß. Die beiden Saccharasen unterscheiden sich auch hinsichtlich der Abhängigkeit von Neutralsalzen. Beim Hefeinvertin ist kein Einfluß von Neutralsalzen auf die enzymatische Wirkung beobachtet worden, abgesehen von der Hemmung, die nach S. M. NEUSCHLOSS[1]) bei sehr hoher Konzentration von Salzen ausgeübt wird. Dagegen hat H. BIERRY[2]) gefunden, daß die Darmsaccharase bei der Dialyse wirkungslos und auf Zusatz von Natriumchlorid wieder aktiv wird.

Bei Hefesaccharase könnte aber ein Einfluß von Neutralsalzen auf die Wirkung durch zu viel Fremdkörper bisher verdeckt worden sein. Darum verglichen wir die Reaktionsgeschwindigkeit in wäßriger und in phosphathaltiger Lösung mit Invertin vom Zeitwert 0,20 nach 3tägiger Dialyse gegen fließendes destilliertes Wasser.

[1] H. v. EULER und J. LAURIN, Diese Zs. Bd. 108, S. 64 [1919]; Biochem. Zs. Bd. 102, S. 258 [1920]; H. v. EULER und K. MYRBÄCK, Diese Zs. Bd. 115, S. 68 [1921].
[2] Diese Zs. Bd. 115, S. 43 [1921].
[1]) Pflügers Arch. Bd. 181, S. 45 [1919/20].
[2]) Biochem. Zs. Bd. 40, S. 357 [1912]; Bd. 44, S. 415 [1912].

		0 Min.	27 Min.	69 bzw. 70,5 Min.
a) Invertin + Rohrz. in Wasser;	$p_H = 6,19$	5,05	3,75	2,21
b) Invertin + Rohrz. m. Phosphat;	$p_H = 6,19$	5,05	3,76	2,20

Das Phosphat ist also ohne Einfluß auf die Wirkung.

Es vermindert aber nach den Versuchen 5 und 6 der Tab. 14 die Temperaturempfindlichkeit, es wirkt wie andere Elektrolyte stabilisierend.

4. Elektrische Überführung.

C. A. PEKELHARING und W. E. RINGER[3] übten in einer Untersuchung „Zur elektrischen Überführung des Pepsins" Kritik an der Reinheit des Grüblerschen Pepsins, mit dem L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN[4] das elektrische Verhalten geprüft hatten, und sie schrieben der Beimischung von Albumosen und Peptonen einen großen Einfluß auf das elektrische Verhalten zu. Diese Auffassung von PEKELHARING und RINGER [74] wird von MICHAELIS und DAVIDSOHN[1]) mit Beschränkung auf chemische Verbindungen aus Enzymen und Begleitstoffen angenommen, aber nicht für Kolloidgemische. „Man kann wohl ganz allgemein den Satz ableiten, daß ein Kolloid den isoelektrischen Punkt eines zweiten, gleichzeitig in Lösung befindlichen Kolloids nicht verändert, wofern nicht eine nachweisliche chemische Affinität der beiden Kolloide zu einander besteht . . ." Es wird indessen richtiger sein, die Annahme von Verbindungen zu vermeiden, wenn es sich um die Assoziation eines Enzyms, z. B. mit Eiweißstoffen, handelt. Die wechselnden Adsorptionsaffinitäten, die dem Invertin verschiedener Reinheit gegenüber elektronegativen Adsorbentien eigen sind, fordern eine Prüfung des reineren Enzyms im elektrischen Felde. Die Erfahrungen der Adsorptionsmethoden bestätigen sich dabei qualitativ. Das nach der Reinigung mit Tonerde durch Kaolin adsorbierbare Invertin zeigt kathodische Wanderung bei der Kataphorese. Aber die quantitative Untersuchung ergibt, daß bei Aciditäten, die für vollständige Adsorption durch Kaolin genügen, nur ein Bruchteil des Invertins positiv geladen ist. Wird dieser durch das Adsorbens entfernt, so scheint die Lösung weitere Anteile von Enzym zusammen mit gewissen Begleitern positiv geladen nachzuschicken bis zur vollständigen Adsorption. Die elektrische Überführung, deren präparative Anwendung die folgenden Messungen vorbereiten, ermöglicht vielleicht vollkommenere Fraktionierung als die Anwendung von Adsorptionsmitteln.

Wir bedienten uns des von K. LANDSTEINER und W. PAULI[2]) angegebenen Apparats in der Modifikation von L. MICHAELIS[3]). Als unpolarisierbare Elektroden wählten wir Zn in $ZnSO_4$[4]). Die Klemmenspannung betrug 220 Volt. Das Volumen des [75] Mittelgefäßes einschließlich der beiden Hahnbohrungen wurde durch Auswägen mit

[3] Diese Zs. Bd. 75, S. 282 [1911].

[4] Biochem. Zs. Bd. 28, S. 1 [1910].

[1]) Über die Kataphorese des Oxyhämoglobins, Biochem. Zs. Bd. 41, S. 102 [1912]; vgl. auch L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN, ebenda Bd. 110, S. 217 [1920].

[2]) 25. Kongreß f. inn. Med., Wien 1908, S. 57.

[3]) Biochem. Zs. Bd. 16, S. 81 [1909]; Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914, S. 192.

[4]) 0,5 bis 1,0 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ für jeden Elektrodenschenkel.

Quecksilber zu 30,60 ccm ermittelt. Die nach 24stündigem Stromdurchgang in den Seitengefäßen nachweisbaren Zinkmengen entsprachen rund 0,02 g $ZnSO_4$ in 25 ccm. Ihr Einfluß auf die Invertinbestimmungen der Seitenflüssigkeiten kann vollkommen vernachlässigt werden. Die Inversionsgeschwindigkeit durch ein Präparat vom Zeitwert 4,7 Minuten wurde durch einen Gehalt der Bestimmungslösung von 0,01 und 0,1% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ nur um 2,0 bzw. 5,3% vermindert.

Anfangsdrehung = 5,00°; 1- bis 4fache Puffermenge.

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	Zeit (Min.)	Drehung (°)	$k \cdot 10^4$	Aktivität (%)
0,00	40,0	1,18	94,5	100,0
0,01	40,0	1,21	92,5	98,0
0,10	40,5	1,28	89,5	94,7
1,00	40,5	2,38	55,3	58,5

Am Beispiel 6 der Tab. 15 sei der Verlauf einer Kataphorese und die Bestimmung der übergeführten Enzymmengen näher geschildert. Angewandt war mit Aluminiumhydroxyd gereinigtes, durch Kaolin gut adsorbierbares Invertin vom Zeitwert 4,7. Als Mittelflüssigkeit diente eine 0,33proz. Lösung in $^n/_{50}$-Essigsäure, die Seitengefäße waren mit $^n/_{50}$-Essigsäure beschickt. Nach Aufsetzen der Elektroden wurde der Apparat in einem Kellerraum erschütterungsfrei aufgestellt und zum Ausgleich der Temperatur und des hydrostatischen Druckes sich selbst überlassen, ehe wir die Hähne zu beiden Seiten des Mittelgefäßes öffneten. Im Tyndallkegel traten dabei keine Strömungen an den Grenzflächen auf. Die beiden Elektroden wurden für 66 Stunden mit einer Gleichstromquelle von 220 Volt verbunden. Nach dem Auseinandernehmen des Apparates entleerten wir die Kathoden- und Anodenlösung, um jede mit etwas Spülflüssigkeit auf 30 ccm zu bringen.

Aktivität der Anodenflüssigkeit, gemessen unter den Bedingungen des Vergleichszeitwertes: 10 ccm in 50 ccm Rohrzuckerlösung; nach 47 Minuten $\alpha = 3,45°$; $p_H = 2,9$ (color.).

Kathodenlösung: 10 ccm auf 50; nach 49 Minuten $\alpha = 1,60°$; $p_H = 3,2$.

p_H der Mittelflüssigkeit zu Beginn und am Ende des Versuches 2,95.

Auf Grund der in Tab. 4 (S. 24) mitgeteilten Beziehung zwischen den verschiedenen Massen des Invertins berechnen wir hieraus die Zeit, die nötig wäre, um durch das Enzym der Mittelflüssigkeit sowie durch seine übergeführten Beträge 4 g Rohrzucker in 25 ccm bei 15,5° zur Nulldrehung zu spalten. Sie beträgt für die Mittel-, Anoden- und Kathodenflüssigkeit 2,53, 363 und 140 Minuten.

[76] Tabelle 15. Beispiele für die Wanderung des Invertins im elektrischen Feld.

Nr.	Zusammensetzung der Mittel- und Seitenflüssigkeiten; Angabe der [H·]	Dauer des Stromdurchganges Stunden	Nulldrehungszeit der Anoden-Mittel-Kathoden-Flüssigkeit			Wanderung in % zur	
						Anode	Kathode
1	Autolysat (1 Hefe + 2 Wasser + Toluol); H_2O; nicht gem.	70	775	6,18	∞	0,80	0,00
2	Autolys. analoger Darst. 1½ Jahre alt; nicht gem.	16	840	6,86	∞	0,82	0,00
3	Autolys. wie 2 + 1/40 Vol. $^n/_1$-Essigs.; Seitengefäße $^n/_{50}$-Essigs.	18	1110	7,07	∞	0,64	0,00
4	0,2proz. Lösung eines d. Kaolin schwer adsorbierbaren tonerdeger. Inv. v. Ztw. 8,45; dest. Wasser; nicht gem.	64	—	6,9	13200	—	0,05
5	Dass. in $^n/_{50}$-Essigs.; Anode $p_H = 2,9$; Kathode $p_H = 3,0$ (color.)	23	1170	7,1	3880	0,61	0,18
6	Präp. v. Ztw. 4,7 in $^n/_{50}$-Essigs.; Mittelflkt. p_H 2,9 bis 3,0; Kath. am Ende 3,4 (color.)	66	363	2,53	140	0,70	1,80

Tabelle 15 (Fortsetzung).

Nr.	Zusammensetzung der Mittel- und Seitenflüssigkeiten; Angabe der [H˙]	Dauer des Stromdurchganges Stunden	Nulldrehungszeit der Anoden-Mittel-Kathoden-Flüssigkeit			Wanderung in % zur	
						Anode	Kathode
7	Präp. aus Neutralautolys. v. Ztw. 1,0 in dest. Wasser; nicht gem.	22	96	0,52	27	0,54	1,03
8	Dasselbe Präp. in $^n/_{50}$-Acetat; p_H = 6,0	18	97	1,04	70	1,07	1,40
9	Wie 8, Mittelflkt. enthält überdies 15,8 mg Eieralbumin; p_H = 6,0	18	117	1,04	46	0,89	2,26
10	Präp. aus pankreasentl. Hefe, Zeitw. 1,0 in dest. Wasser; p_H = 6	19	347	5,0	217	1,44	2,30

[77] Die Tab. 15 läßt in einigen Beispielen erkennen, wie mit zunehmender Reinheit des Invertins der übergeführte Anteil zunimmt. Bei annähernd gleicher Aktivität der Mittelflüssigkeiten von Beispiel 1 und 10 sind im Hefeautolysat in 70 Stunden nur 0,8% des Enzyms zur Anode gewandert, während vom Präparat mit dem Zeitwert 1 schon nach 19 Stunden 1,44% im Anoden- und 2,30% im Kathodengefäß nachgewiesen werden konnten. Der Vergleich von Beispiel 8 und 9 ergibt Zunahme der kathodischen Wanderung eines 1-Minuten-Präparats durch geringen Zusatz von Eieralbumin bei $p_H = 6{,}0$. Die Erfahrungen über Reproduzierbarkeit der einzelnen Messungen — namentlich an gereinigten Saccharaselösungen, deren Tyndalleffekt äußerst schwach ist — erlauben indes noch nicht, diesen Effekt mit Bestimmtheit der Beimischung zuzuschreiben.

5. Zur Stabilisierung.

Ein mit Tonerde und mit Kaolin gereinigtes Präparat, das nach der Dialyse den Zeitwert 7,5 hatte, verlor bei 3tägigem Stehen 22% seiner Wirkung. Darauf versetzte man diese 0,15proz. Enzymlösung, deren Zeitwert jetzt 9,6 war, mit verschiedenen Schutzstoffen, nämlich mit 50% ihres Trockengewichts. Zur vergleichenden Bestimmung der trockenen Präparate wurden Proben bei Zimmertemperatur im Luftstrom abgedampft, andere Proben nach 14- und nach 20tägigem Stehen der Lösungen bestimmt (vgl. Tab. 16).

Calciumchlorid schützte beim Eindampfen nicht. Hefegummi mit Chlorcalcium wirkt ähnlich günstig wie Gummi allein.

Tabelle 16.

Zusatz	Nach 14 tägigem Stehen		Nach 20 tägigem Stehen		Nach dem Abdampfen	
	Zeitwert	Aktivitätsverlust (%)	Zeitwert	Aktivitätsverlust (%)	Zeitwert	Aktivitätsverlust (%)
Ohne Zusatz	14,7	35	14,7	35	—	—
Chlorcalcium	9,7	1,5	11,1	14	106	91
Glykokoll	10	5	11,3	15	9,4	0,0
Leucylglycin	9,8	2,5	10,6	9	9,6	0,0
Hefegummi	10,2	6	11,1	14	10	5
Glycerin	10,3	7	11,5	16	10,1	6

[78] Die Schutzwirkung von Hefegummi war auch bei einem mittels der Bleifällung dargestellten Präparat (f_1 der Tab. 6) deutlich, das beim Abdampfen zur Trockne 3/4, beim Verdampfen in 25 % Hefegummi enthaltender Lösung nur halb so viel Aktivität einbüßte.

Invertinlösung f_1	Zeitwert	1,05.		
Zur Trockene verd.	„	4,12,	Verlust	75 %.
Mit Hefegummi verd. . . .	„	1,6,	„	35.

Die günstige Goldzahl von Hefegummi erklärt diese Wirkung. Wir bestimmten mit Hefegummi, der nach dem nicht eben schonenden Verfahren von E. SALKOWSKI[1] frisch dargestellt worden, die Goldzahl nach dem Vorschlag von R. ZSIGMONDY[2] = 0,1. Die Schutzwirkung, die von Invertinpräparaten auf Goldsol ausgeübt wird, ist hauptsächlich durch ihren Gehalt an Hefegummi bedingt. Wir fanden z. B. für ein nur mit Aluminiumhydroxyd gereinigtes, noch 10 % Hefegummi enthaltendes Präparat vom Zeitwert 4,7 die Goldzahl 1, hingegen für ein Präparat von ähnlicher Konzentration, das durch Isolierung aus der Bleifällung so gut wie frei von Hefegummi erhalten worden, die Goldzahl > 10.

Dem mit Bleiacetat, dann mit Tonerde gereinigten Präparat 9 der Tab. 6 (Zeitw. 0,26) kommt die Goldzahl 20 zu.

[1] Chem. Ber. Bd. 27, S. 497 [1894].
[2] Zs. analyt. Chem. Bd. 40, S. 697 [1901].

Zeitschrift für physiologische Chemie **123**, S. 181 [1922].

49. ZUR KENNTNIS DES INVERTINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und WALTER WASSERMANN.

Vierte Abhandlung.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. Aug. 1922.)

I. Auswählende Adsorption aus den Autolysaten.

Die Bedeutung der Adsorptionsmethoden für die Isolierung des Invertins beruht darauf, daß es diesem Enzym wie anderen an chemischen Reaktionen, abgesehen von der spezifischen Enzymwirkung, und an schwer löslichen Derivaten fehlt. Diese Methodik für die Abscheidung der Enzyme hat schon eine lange Vorgeschichte, aber ihre Entwicklung war durch einige Schwierigkeiten gehemmt. Die Enzymadsorbate waren nicht leicht zu zerlegen, was zu der noch heute verbreiteten Anschauung geführt hat: „Der Adsorptionsprozeß ist mehr oder weniger irreversibel und unterscheidet sich dadurch von der Adsorption krystalloider Stoffe" [O. HAMMARSTEN und S. G. HEDIN[1]]. Indessen führt schon die ältere Enzymliteratur einige Beispiele an für die Adsorption von Enzymen durch Niederschläge und darauffolgende Elution. Nach dem grundlegenden Versuche von E. BRÜCKE[2] wird Pepsin und ebenso, wie A. MAYER[3] in seiner „Lehre von den chemischen Fermenten" anführt, pflanzliche Diastase durch Bildung eines **[182]** Niederschlags von Calciumphosphat gefällt und dem Adsorbate mit sehr verdünnter Phosphorsäure wieder entzogen. So verhalten sich auch die Invertinadsorbate, die wir in vielen Fällen mit einfachen chemischen Mitteln zu zerlegen vermögen und zwar mit sehr verdünnten Alkalien. Die Elution beruht auf der Überwindung der kleinen Affinitätsbeträge, die in den Adsorbaten wirken, durch etwas stärkere Affinitäten[1]).

Ein viel erheblicheres Hindernis stellten der Anwendung eines Adsorptionsverfahrens die verwickelten und wechselnden Assoziationen der Begleitstoffe mit

[1] Lehrbuch der physiologischen Chemie, 9. Aufl., 1922, S. 38.
[2] Sitzungsberichte der mathemat.-naturwiss. Klasse d. K. Akad. d. Wissensch. Wien 43. Bd., II. Abt., S. 601, und zwar S. 603 [1861].
[3] Heidelberg 1882, S. 11.
[1]) Erste Abh., S. 59.

dem Enzym in den Weg, durch welche die Adsorption erschwert und das Verhalten des Enzyms verschleiert wird. Erst im Laufe seiner Reinigung gab sich das Invertin als amphoter zu erkennen und als geeignet für die aufeinanderfolgende Anwendung von Adsorbentien elektropositiver und elektronegativer Natur. Dies ist das Wesentliche der in der ersten Abhandlung[2] mitgeteilten Methodik. Das Verfahren von WILLSTÄTTER und RACKE erfordert zunächst eine Vorreinigung mit Kaolin in acetonhaltiger Lösung, wodurch sich gewisse hartnäckig folgende Proteine beseitigen ließen. Darauf folgte die erste Adsorption mit Tonerde in ebenfalls (28%) Aceton enthaltender Lösung und Elution mit 0,04proz. Ammoniak. Nach dem Fällen der eingeengten Lösung durch Aceton enthielt das Invertin nur noch Spuren von Eiweiß, aber große Mengen von Hefegummi. Es ließ sich davon befreien durch die zweite Adsorption, nämlich mit Kaolin, und Elution mit sehr verdünnter Natriumcarbonatlösung.

Für den Reinheitsgrad der Präparate war die Anwendung möglichst geringer Mengen der Adsorbentien entscheidend. Es war „eine Erfahrung aus dieser Arbeit, daß eine bestimmte Sorte Aluminiumhydroxyd unter verschiedenen Bedingungen z. B. in wäßriger oder acetonig-wäßriger Lösung ungefähr gleiche Stoffmengen, aber verschiedene Mengen Enzym adsorbiert. Daher wird das Invertin, je weniger Aluminiumhydroxyd man braucht, um eine gegebene Menge desselben zu adsorbieren, [183] in desto reinerem Zustand dadurch erhalten. Die zur Adsorption des Invertins erforderliche Menge von Aluminiumhydroxyd ist ein gewisses Maß seiner Selektivität. Wenn z. B. für eine mit 40 Vol.-% Aceton vermischte Invertinlösung dreimal weniger Aluminiumhydroxyd zur quantitativen Adsorption des Enzyms nötig war, wie in der wäßrigen Lösung, so war auch das adsorbierte Trockengewicht für die gegebene Invertinmenge im ersten Falle ungefähr dreimal geringer". Die Wirkung des Acetons beruht vielleicht darauf, daß eine amphotere Verbindung in acetonhaltiger Lösung stärker sauer reagiert, wie es für wäßrig-alkoholische Lösungen vor kurzem gezeigt wurde[1]).

In der Absicht, das Adsorptionsvermögen der Tonerde für Enzyme zu steigern, haben WILLSTÄTTER und H. KRAUT eine (noch nicht veröffentlichte) Arbeit* in Angriff genommen, die sich auf Hydrate des Aluminiumoxyds von verschiedener Darstellung, Zusammensetzung und chemischer Reaktionsfähigkeit bezieht. In dieser Untersuchung wurde erkannt, daß die Tonerde das Invertin bei großer Verdünnung seiner Lösung viel mehr auswählend adsorbiert, daß ihr Adsorptionsvermögen für Invertin ein vielfach größeres wird. Die Einflüsse der Begleitstoffe, die der Adsorption entgegenwirken, erscheinen bei starker Verdünnung mit Wasser und noch mehr bei Gegenwart von Säure abgeschwächt, gewiß infolge hydrolytischen Zerfalls gebildeter Additionsprodukte.

Nach der Adsorptionsformel von H. FREUNDLICH und nach vielen Erfahrungen war zu erwarten, daß eine gegebene Menge Adsorbens aus einer schwachen Lösung

[2] Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21].

[1]) R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 54, S. 2988 [1921].

* *Abh. 16 und folgende.*

verhältnismäßig mehr Substanz aufnimmt als aus einer konzentrierteren. Allein es läßt sich nicht vorhersehen, daß die absolute Menge adsorbierten Enzyms mit dem Verdünnen der Lösung steigt und daß sich die Adsorption in höherem Maße für Invertin beim Verdünnen des Hefeautolysates selektiv gestaltet als für irgend ein Protein, eine Nucleinsubstanz oder ein anderes Protoplasmazerfallsprodukt. In der Tat beruht die Beobachtung von WILLSTÄTTER und KRAUT, die unserer Untersuchung zugrunde [184] liegt, auf der Anwendung von Invertinlösungen, die ganz besonderen Bedingungen genügen. Würde man einfach einen Hefeauszug, dargestellt nach einem der üblichen Autolyseverfahren, unter starker Verdünnung mit viel Tonerde oder Kaolin behandeln, so wäre das Adsorbens nicht imstande, daraus Invertin auswählend zu adsorbieren.

Das Adsorptionsvermögen der Tonerde oder eines anderen Adsorptionsmittels wurde in der ersten Abhandlung (S. 66) durch den „Adsorptionswert" ausgedrückt. Dieses Maß gibt die Rohrzuckermenge an, die von 1 g unter bestimmten Bedingungen mit Invertin gesättigtem Adsorbens unter den Verhältnissen der Zeitwertdefinition in einer Minute zur Nulldrehung invertiert wird. Danach kommt dem mit Invertin beladenen Aluminiumhydroxyd der Adsorptionswert 1 zu, wenn 1 g desselben unter den Bedingungen der Zeitwertbestimmung 1 g Rohrzucker in einer Minute zu 75,75 % invertiert. Das Adsorbens (1 g) hat dann Invertin entsprechend dem M.Z.Q. 0,25 aufgenommen. Es ist zweckmäßiger, die Einheit des Adsorptionswertes auf die Inversion von 4 g Rohrzucker zur Nulldrehung zu beziehen, sie nämlich so zu wählen, daß das Adsorbens mit Invertin[1] vom M.Z.Q. 1 gesättigt ist. Der Adsorptionswert gibt also die Invertinmenge in M.Z.Q. an, die von 1 g Adsorbens unter bestimmten Bedingungen aufgenommen wird. Ferner ist es vorzuziehen, daß die Angaben für Tonerde auf Al_2O_3, nicht auf $Al(OH)_3$ bezogen werden. Der ältere Adsorptionswert wird in den abgeänderten, der im folgenden als Maß dient, mittels des Faktors $\frac{1}{4} \cdot \frac{156,2}{102,2} = 0,38$ umgerechnet.

Das Reziproke des Adsorptionswertes gibt die Menge Adsorbens an, die unter bestimmten Bedingungen erforderlich ist, um Invertin vom M.Z.Q. 1 zu adsorbieren.

Für eine gegebene Sorte von Tonerde ist der Adsorptionswert in erster Linie von der Zusammensetzung der [185] Enzymlösung abhängig, ferner von den Enzymkonzentrationen vor der Adsorption und nach Einstellung des Gleichgewichtes. Wir ergänzen daher den Adsorptionswert (A.W.) mit der Angabe des Volumens der Invertinlösung in ccm, das den M.Z.Q. 1 enthält, und des Bruchteils der Enzymadsorption. Beispielsweise fanden wir mit einem durch Kaolin (ohne Aceton) vorbehandelten Autolysat:

A.W. (400; 17 %) = 0,166 (n. d. früheren Maße 0,435).
A.W. (8000; 96 %) = 0,94 (n. d. früheren Maße 2,46).

[1] Dieses Maß der Invertinmenge, I. Abh., S. 8, ist der Quotient des in Form von Hefe, Autolysat oder Präparat dosierten Materials und seiner durch den Zeitwert gemessenen Wirkung.

Adsorption durch Tonerde.

Die angewandten Invertinlösungen waren durch 6tägige Autolyse aus Brauereihefe mit der doppelten Menge Wasser unter Zusatz von Toluol gewonnen; sie enthielten gewöhnlich M.Z.Q. 1 in 300 bis 400 ccm. In den Adsorptionsversuchen mit den frisch dargestellten, mit Kaolin ohne Aceton vorbehandelten Lösungen ergaben sich für Aluminiumhydroxyd Adsorptionswerte von etwa 0,06 bis 0,16 bei einem Adsorptionsgrade von 10 bis 20% des Invertins. Dieselben Tonerdemengen adsorbierten bei 10facher Verdünnung 50 bis 70, bei 20- bis 50facher 80 bis 95% des Enzyms, die Adsorptionswerte stiegen dementsprechend auf 0,5 bis 0,9.

Das nämliche Autolysat ohne Reinigung mit Kaolin hatte gar keinen Einfluß der Verdünnung erkennen lassen. Die Adsorptionswerte 0,93 und 0,95 für die Verdünnungen 300 und 6000 waren dabei überraschend hoch. Es zeigt sich hier, daß eben die Nebenprodukte (Proteine), welche vom Kaolin am leichtesten entfernt werden, die Aufnahme des Invertins durch die Tonerde als Koadsorbentien in hohem Maße befördern.

Bei den frischen Autolysaten hatte auch die Reinigung mit Kaolin in 28% Aceton enthaltender Lösung nur einen unvollkommenen Erfolg. Der A.W. (Verdünnung 300) stieg zwar auf 1,1 an (bei 13% Adsorption), aber es war hier 20fache Verdünnung mit Wasser nötig, um ihn zu erhöhen und dann nur auf 1,6 (bei 19,4% Adsorption).

Die auswählende Adsorption wurde erst deutlich nach Altern der Autolysate. Die dabei erfolgenden Abbauvorgänge, [186] die in der dritten Abhandlung eingehender behandelt wurden, greifen die mit dem Invertin vergesellschafteten Inhaltsstoffe der Hefe an und verändern dadurch das Verhalten des Enzyms selbst gegenüber den Adsorbentien.

Nach 6 Wochen langem Stehen war das Enzym deutlich leichter adsorbierbar, besonders aus verdünnten Lösungen. Schon bei 10facher Verdünnung der mit Kaolin ohne Aceton vorbehandelten Invertinlösung erhob sich der Adsorptionswert von 0,2 (17% Adsorption) auf 1,2 (97% Adsorption). Noch erfolgreicher war die Verarbeitung der gealterten Autolysate, als sie nach den Angaben von Willstätter und Racke aus wäßrig-acetoniger Lösung mit Kaolin enteiweißt wurden. Für die so vorbehandelten unverdünnten Lösungen (M.Z.Q. 1 in ca. 600 ccm) betrug der Adsorptionswert der Tonerde etwa 1 (20% Adsorption), bei 10facher Verdünnung stieg er auf 4,3 (fast 80% Adsorption).

Die günstigste Dauer des Alterns betrug in unseren Versuchen 6 bis 8 Wochen. Bei längerem Reifen der Autolysate begannen die Adsorptionswerte wieder zu sinken (Vers. 22 bis 25 der Tab. 1).

Für die Tonerdeadsorption ist die sehr schwach saure Reaktion, die das Autolysat nach der Verdünnung besitzt, die geeignetste (Nr. 25 bis 27). Säuert man die Invertinlösung mit Essigsäure an (Titrationsacid. $^{n}/_{20}$), so sinkt der Adsorptionswert auf 0,5, noch viel tiefer, wenn man mit Ammoniak genau lackmusneutrale Reaktion einstellt.

Wird wie bei WILLSTÄTTER und RACKE die Adsorption aus acetonhaltiger Lösung vorgenommen, so erhöht sich bei der großen Verdünnung der beobachtete Adsorptionswert noch etwas mehr, aber auf diese nicht bedeutende letzte Steigerung mußte verzichtet werden, da zu große Mengen Aceton dafür nötig wären.

Die Adsorption unter den angegebenen Bedingungen ist in solchem Maße selektiv, daß sie nur etwa $^1/_{20}$ bis $^1/_{30}$ der Tonerdemenge wie in den entsprechenden Versuchen von WILLSTÄTTER und RACKE mit konzentrierteren acetonfreien Invertinlösungen erfordert. Daher besitzt das aus einem solchen [187] Adsorbat eluierte Invertin ohne weiteres etwa denselben Reinheitsgrad (Zeitwert < 1) wie die in der I. Abhandlung durch wiederholte Adsorptionsprozesse und Fällung gereinigten Präparate und ist gleich diesen vollkommen frei von Hefegummi. Diesem Reinheitsgrad stehen Invertinzeitwerte von etwa 28 gegenüber, die WILLSTÄTTER und RACKE für die durch die Tonerde adsorbierte Substanz ermittelt haben (a. a. O. S. 68), als die Adsorption aus wäßriger (acetonfreier) Lösung vorgenommen wurde, und zwar ebenfalls aus den mit Kaolin gereinigten Autolysaten.

Die Tonerdeadsorbate stehen mit den Autolysaten im Gleichgewicht, die viel eluierend wirkende Stoffe (Koeluentien) enthalten. Daher erhöht sich der Adsorptionswert (Vers. 28 d. Tab.) sehr wesentlich, wenn das Adsorbat mit fast reinem Wasser im Gleichgewicht steht. Wir verwendeten für diesen Versuch ein nach der Kaolinmethode gereinigtes Invertinpräparat vom Zeitwert 0,6 und fanden bei der Verdünnung M.Z.Q. 1 in 1400 ccm bei fast vollständiger Adsorption den A.W. 19,5[1] der Tonerde.

Die in der Tab. 1 zusammengestellten Versuche zeigen Unterschiede im Adsorptionsvermögen desselben Aluminiumhydroxyds mit demselben Autolysate im Verhältnis von 1:90. Sie lehren, daß die selektive Wirkung der Tonerde und die praktisch günstigste Steigerung ihres Adsorptionsvermögens bedingt wird durch Altern der Autolysate, Vorbehandlung mit Kaolin in acetonhaltiger Lösung und etwa 20fache Verdünnung.

Adsorption durch Kaolin.

In der ersten Arbeit dieser Reihe war gefunden worden (S. 85 und 99), daß das aus dem Tonerdeadsorbat eluierte Invertin, und zwar erst dieses, durch Kaolin adsorbierbar ist. „Durch die Behandlung mit Aluminiumhydroxyd ist das Enzym von den Koadsorbentien, Begleitstoffen überwiegend saurer Natur, abgetrennt worden, mit denen es zuvor assoziiert war. Es zeigt in diesem Reinheitsgrad das Verhalten eines [189] amphoteren Stoffes und wird nun sowohl von elektronegativen wie elektropositiven Adsorbentien aufgenommen." Es gelang nun, analog den Beobachtungen mit Tonerde, an gealterten, sehr verdünnten Lösungen, das Invertin auch unmittelbar aus den Autolysaten, und sogar ohne irgendeine Vorreinigung derselben, wie sie für die Tonerdeadsorption nötig ist, durch Kaolin selektiv zu adsorbieren, so daß sich

[1] Dieser Adsorptionswert, der bei Gegenwart von Natriumchlorid ermittelt wurde, ließ sich noch weit übertreffen.

[188] Tabelle 1. Auswählende Adsorption mit Tonerde (Sorte B*).

Nr.	Alter des Autolysates	Vorbehandlung	Invertinmenge M.Z.Q.	Al_2O_3 g	Verdünnung von M.Z.Q. 1	Adsorptionsgrad %	Adsorptionswert
1	8 Tage	keine	0,179	0,082	300	42,7	0,93
2	8 ,,	,,	0,179	0,082	6000	43,8	0,95
3	8 ,,	Kaolin ohne Aceton	0,121	0,186	400	9	0,059
4	8 ,,	,, ,, ,,	0,121	0,1395	400	19	0,16
5	8 ,,	,, ,, ,,	0,024	0,0279	4000	46	0,40
6	8 ,,	,, ,, ,,	0,121	0,186	8000	83	0,54
7	8 ,,	,, ,, ,,	0,121	0,1395	20000	93	0,81
8	8 ,,	,, ,, ,,	0,024	0,0279	8000	99	0,85
9	12 ,,	,, ,, ,,	0,058	0,060	400	17	0,16
10	12 ,,	,, ,, ,,	0,058	0,060	4000	76	0,73
11	12 ,,	,, ,, ,,	0,058	0,060	8000	96	0,93
12	14 ,,	,, mit ,,	0,170	0,0205	300	13	1,1
13	14 ,,	,, ,, ,,	0,170	0,0205	3000	11,8	0,98
14	14 ,,	,, ,, ,,	0,170	0,0205	6000	19,4	1,6
15	6 Wochen	,, ohne ,,	0,169	0,1395	300	17,2	0,21
16	6 ,,	,, ,, ,,	0,169	0,1395	3000	97	1,2
17	6 ,,	,, ,, ,,	0,169	0,1395	6000	98,8	1,2
18	6 ,,	,, mit ,,	0,113	0,0205	600	20,3	1,1
19	6 ,,	,, ,, ,,	0,113	0,0205	4500	77,9	4,3
20	6 ,,	,, ,, ,,	0,113	0,0205	9000	84	4,6
21	6 ,,	,, ,, ,,	0,136	0,0205	3500	80	5,3
					(28 % Aceton)		
22	3 Wochen b. 15°	,, ,, ,,	0,0927	0,0196	11000	30,8	1,5
23	1 W. 15°, 2 W. 30°	,, ,, ,,	0,0843	0,0196	12000	74,9	3,2
24	1 W. 15°, 4 W. 30°	,, ,, ,,	0,0753	0,0098	13000	36,5	2,8
25	1 W. 15°, 7 W. 30°	,, ,, ,,	0,074	0,0098	13000	33,8	2,5
26	1 W. 15°, 7 W. 30°	,, ,, ,,	0,074	0,0098	13000	7	0,53
					($^n/_{20}$-Essigs.)		
27	1 W. 15°, 7 W. 30°	,, ,, ,,	0,074	0,0098	13000	3	0,23
					(neutral)		
28	Invertin v. Z.W. 0,60	—	0,386	0,0186	1400	94,5	19,5

darauf die einfachste Methode gründen läßt, Invertin von hohem Reinheitsgrade, frei von Hefegummi, zu isolieren. Es ist nötig, dafür die Autolysate gealtert, sehr verdünnt und angesäuert zu verwenden.

Der wichtigste Umstand, auf den es dabei ankommt, ist die Acidität der Invertinlösung. Ihr Einfluß war schon von WILLSTÄTTER und RACKE erkannt worden. Sie fanden die Adsorption durch Kaolin sehr gesteigert „in schwach essigsaurer Lösung, z. B. in $^n/_{25}$-normaler, für die nur etwa $^1/_5$ der Kaolinmenge wie für entsprechende neutrale Lösungen erforderlich ist". Der Einfluß der Acidität ist in unseren Versuchen noch größer, da wir mit den viel amphotere Stoffe enthaltenden rohen Invertinlösungen arbeiten und da wir Kaolin von neutraler Reaktion auf Lackmus anwenden. Das Kaolin von WILLSTÄTTER und RACKE war durch Erhitzen mit Salzsäure und Auswaschen mit Wasser in seinem Adsorptionsvermögen gesteigert worden. So behandelt, reagiert es sauer, es ist noch mit Salzsäure beladen und besitzt erhöhtes Adsorptionsvermögen für Invertin. Für unsere Untersuchung diente elektroosmotisch

* *In der Originalabh. ist irrtümlich Sorte A angegeben.*

gereinigtes Kaolin, das uns Herr Direktor Dr. ERWIN MAYER der Elektro-Osmose A.-G. in Wien freundlichst zur Verfügung stellte. Wenn dieses Kaolin auf Invertin von höherem Reinheitsgrad in wäßriger Lösung einwirkt, so ist sein Adsorptionsvermögen gering, in essigsaurer Lösung bedeutend. Wir behandelten z. B. ein Invertinpräparat vom Zeitwert 0,6 und zwar 500 ccm, enthaltend M.Z.Q. 0,39, mit 1,25 g Kaolin. Die Adsorption betrug 5,5 % vom Invertin, entsprechend einem Adsorptionswert von 0,02. In einem anderen Versuche mit Invertin vom Zeitwert 0,75 ließen wir 20 g Kaolin auf 2 l, enthaltend M.Z.Q. 2,7, einwirken. Die Adsorption betrug 19 %, entsprechend einem Adsorptionswert von 0,026, [190] während der A.W. für eine ähnliche $^n/_{20}$-essigsaure Invertinlösung 0,15 betrug.

Die Autolysate sind an sich unzureichend sauer. Die Versuche 1 bis 4 der Tab. 2 lassen bei der gegebenen Acidität der Autolysate, seien sie unverdünnt oder verdünnt, frisch oder gealtert oder auch mit Kaolin vorbehandelt, keine Adsorption des Enzyms durch Kaolin erkennen.

Die geeignete Acidität ist die einer $^n/_{20}$-Essigsäure; sie wird in der erforderlichen Zeitdauer vom Invertin vertragen. In einigen Versuchen (Nr. 6 und 7 der Tab. 2) zeigte sich auch bei optimaler Acidität kein Einfluß der Verdünnung an einem frischen (z. B. 14 Tage alten) Autolysat. Bei gealterten Hefeauszügen macht aber ähnlich wie bei der Tonerdeadsorption die Verdünnung ihren Einfluß geltend und zwar so, daß es unnötig ist, die Autolysate zuvor in neutraler wäßriger oder acetonhaltiger Lösung mit Kaolin zu reinigen, zumal durch diese Behandlung die Eiweißkörper doch nur sehr unvollkommen entfernt werden.

Die Menge Kaolin, mit der das Invertin quantitativ adsorbiert wird, ist nur ein Bruchteil der von L. MICHAELIS[1] für die Entfernung von Eiweiß aus den Invertinlösungen empfohlenen (15 bis 20 g für 100 ccm invertinarmer Autolysate).

Der Adsorptionswert des Kaolins betrug bei günstiger Acidität für frisch dargestelltes (z. B. 14 Tage altes) Autolysat 0,007 und stieg für die 6 bis 8 Wochen alten auf 0,06 bis 0,09 an, ohne bei noch älteren Autolysaten merklich zu differieren. Mit der Verminderung der Kaolinmenge geht die Verbesserung des Reinheitsgrades des adsorbierten Invertins Hand in Hand.

Einfluß der Verdünnung auf die Fällbarkeit durch Bleiacetat.

In der III. Abhandlung über Invertin ist eine Methode der Isolierung mittels der Bleiacetatfällung mitgeteilt worden. Es sind Begleitstoffe des Enzyms in den Hefeauszügen, die [191] vom Bleiacetat niedergeschlagen werden. Aus frischen Autolysaten vermögen die Bleifällungen sehr wenig Invertin zu adsorbieren, aus gealterten das gesamte. Nach Altern von einigen Monaten genügten oft $^2/_3$ der zur vollständigen Bleifällung nötigen Menge Bleiacetat, um 90 % des Invertins zu adsorbieren.

[1] Biochem. Zs. Bd. 7, S. 488 [1907/08]; L. MICHAELIS und M. EHRENREICH, Biochem. Zs. Bd. 10, S. 283, 295 [1908]; L. MICHAELIS in Abderhaldens Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden [1910] III. Bd., S. 7.

Tabelle 2. Auswählende Adsorption mit Kaolin.

Nr.	Alter des Autolysats	Vorbehandlung	Acidität	Invertinmenge M.Z.Q.	Kaolin g	Verdünnung von M.Z.Q. 1	Adsorptionsgrad %	Adsorptionswert
1	vom 27. IV. 22, 14 Tage alt	keine	—	0,105	2	200 u. 4000	0	0
2	ebenso	Kaolin mit Aceton	—	0,073	2	5200	0	0
3	15 Monate	keine	·	0,105	2	200 u. 4000	0	0
4	15 „	Kaolin mit Aceton	—	0,059	2	6800	6,8	0,002
5	27. IV., 14 Tage . . .	„ „ „	$^{n}/_{50}$-Essigs.	0,073	2	5200	37	0,014
6	7. V., 14 „	keine	$^{n}/_{20}$ „	0,105	2	400	16	0,008
7	7. V., 14 „	„	$^{n}/_{20}$ „	0,274	5	4000	12	0,007
8	15 Monate	Kaolin mit Aceton	$^{n}/_{50}$ „	0,044	2	500	0	0
9	15 „	„ „ „	$^{n}/_{50}$ „	0,044	2	8000	94	0,021
10	13. III. 22, 8 Wochen	keine	$^{n}/_{20}$ „	0,183	1	5000	41,5	0,076
11	13. III. 22, 8 „	„	$^{n}/_{20}$ „	0,183	3	5000	97	0,06
12	15 Monate	„	$^{n}/_{20}$ „	0,262	5	4000	97	0,051
13	13. III. 22, 4 Monate	„	$^{n}/_{20}$ „	12,9	125	16000	86	0,089
14	13. III. 22, 3 „	„	$^{n}/_{20}$ „	5,302	66	16000	98,5	0,079

Auch diese Adsorption wird durch Verdünnung der Autolysate, mit sprungweiser Steigerung bei sehr großer Verdünnung, befördert, weil die Verdünnung der Assoziation des Enzyms mit den Begleitstoffen entgegenwirkt.

Die Versuche sind mit einem unter Zusatz von Ammonphosphat gewonnenen 5 Monate alten Autolysate ausgeführt, von dem 100 ccm zur Fällung 6 g Bleizucker erforderten, bis [192] eben im Filtrat Blei nachzuweisen war. Die Menge des adsorbierten Enzyms wird in den Versuchen, für deren Ausführung wir Frl. Dr. JOH. GRASER zu Dank verpflichtet sind, durch Invertinbestimmung im Autolysate vor und nach der Bleifällung ermittelt.

Fällung mit 3 g Bleiacetat, d. i. der Hälfte der zur gesamten Niederschlagsbildung erforderlichen Menge.

Aus unverdünntem Autolysat wurden von Invertin gefällt 40 %
„ 5 fach verdünntem „ „ „ „ „ 66 %
„ 10 „ „ „ „ „ „ „ „ 68 %
„ 20 „ „ „ „ „ „ „ „ 64 %
„ 50 „ „ „ „ „ „ „ „ 96 %
Unter Zusatz v. 40 Vol.-% Aceton „ „ „ „ 82 %

Aus diesen Adsorbaten wurde das Invertin durch ammoniakalisches Wasser schlecht, durch Ammonphosphat zu gegen 50 % eluiert.

II. Isolierung des Invertins mit Kaolin.

Das Verhalten des Ausgangsmaterials, eines 4 Monate alten Hefeautolysates gegen das Adsorbens, prüften wir in einem Vorversuche mit 50 ccm, die in 40 facher Verdünnung mit $^{n}/_{20}$-Essigsäure (M.Z.Q. 1 in 16000 ccm) an 1 g Kaolin 57 % des Invertins abgaben. Zur Isolierung des Enzyms in präparativem Maßstab wurde dann eine zur vollständigen Adsorption nicht genügende Menge Kaolin angewandt, so daß 12 bis 15 % vom Invertin in der Mutterlauge zurückblieben. Es zeigte sich, daß die Eiweißsubstanzen, die bei der auswählenden Adsorption das Invertin begleiten, unter

den Bedingungen des Verfahrens genau zugleich mit dem Invertin in das Kaolin übergehen. Weder durch Abtrennung einer ersten Fraktion noch durch das Zurücklassen eines Anteils vom Invertin im Autolysat war die Beimischung von Eiweiß zu vermeiden. Wurde nach Adsorption von etwa 80 % des Invertins das Filtrat mit weiteren und größeren Mengen Kaolin behandelt, so nahm das Adsorbens nichts mehr von den Proteinsubstanzen auf, obwohl in der Mutterlauge natürlich noch sehr große Mengen von Verbindungen der Proteingruppe enthalten waren. Es ist nur ein gewisser [193] kleiner Teil derselben, der im Adsorptionsverhalten dem Invertin so nahe steht.

Wir verarbeiteten 5 l Autolysat (M.Z.Q. 12,9), die mit 200 l $^{n}/_{20}$-Essigsäure auf die geeignete Verdünnung und Acidität gebracht waren, und führten die Adsorption mit 125 g elektroosmotischem Kaolin aus. Im Filtrat befand sich noch Invertin vom M.Z.Q. 1,81; adsorbiert waren also 86 %, entsprechend dem Adsorptionswert 0,088. Man verfuhr mit den Mitteln des Laboratoriums am besten so, daß in Filtrierstutzen je 200 ccm Autolysat verdünnt, angesäuert und unter kräftigem Rühren mit 5 g Kaolin behandelt wurden; fünf solche Chargen ließen sich zusammen verarbeiten, in der Nutsche auf gehärtetem Filtrierpapier absaugen, mit destilliertem Wasser nachwaschen und zur Elution in der Porzellanschale mit $^{1}/_{2}$ l 0,05 proz. Ammoniak einige Minuten lang anrühren. Die Elution ist schwierig filtrierbar; wir saugten sie durch eine dünne Haut von Kieselgur auf gehärtetem Filter ab, was einige Stunden dauerte, und verwendeten zum Nachwaschen gegen 100 ccm vom 0,05 proz. Ammoniak. Die vereinigten Elutionen, 2,5 bis 3 l, enthielten Invertin vom M.Z.Q. 9,78, entsprechend einer Elutionsausbeute von 88 % des adsorbierten Betrages. Das elektroosmotische Kaolin wird in erheblicher Menge vom verdünnten Ammoniak kolloid gelöst, aber zum großen Teil flockt diese Substanz beim Neutralisieren aus, der Rest beim Eindampfen, wobei Eiweißsubstanzen und farbige Verunreinigungen niedergeschlagen werden. Die ammoniakalische Elution führt noch beinahe allen Farbstoff des angewandten Autolysates mit. Die bräunliche Flüssigkeit säuerten wir mit Essigsäure an, bis sie auf Lackmus neutral, auf Methylorange aber noch alkalisch reagierte ($p_H > 4$) und ließen sie zur vollständigen Ausflockung einige Stunden, mit Toluol überschichtet, im Eisschrank stehen. Nach nochmaligem Filtrieren durch eine Kieselgurhaut war die Elution nur noch schwach gelblich. Ein Teil derselben, M.Z.Q. 2,81, wurde im Vakuum bei einer Destillationstemperatur von 9 bis 15° auf $^{1}/_{5}$ oder $^{1}/_{6}$ eingedampft, was ohne Verlust verlief (M.Z.Q. 2,80), und 3 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert und zwar unter Rühren mittels eines Stromes [194] von Kohlensäure. Da hierbei wieder ein eiweiß- und farbstoffhaltiger Niederschlag ausfiel, war eine nochmalige Filtration durch eine dünne Schicht Kieselgur nötig. Durch Dialyse und Filtration verminderte sich die enzymatische Wirkung um 17,5 % (auf M.Z.Q. 2,32). Der Trockenrückstand des Präparates betrug 69,1 mg, der Zeitwert 0,60. Die Angabe bezieht sich also auf den Zustand nach Eindampfen und Dialysieren und dasselbe gilt für die übrigen Zeitwertbestimmungen dieser Arbeit.

In einem anderen Beispiel mit demselben und ebenso alten Autolysat (2,2 l enthaltend M.Z.Q. 5,30) adsorbierten wir das Invertin fast vollständig. 66 g Kaolin, wofür sich A.W. 0,08 bei gleicher Verdünnung und Acidität wie oben ergab, dienten zur Adsorption und wurden durch 0,05proz. Ammoniak mit einer Ausbeute von 74% eluiert. Das Eindampfen geschah ohne, die Dialyse mit 17% Verlust. Das Präparat wies den Zeitwert **0,48** bis **0,52** auf.

In einem dritten Beispiel mit 3,9 l Autolysat (M.Z.Q. 13,3) wurden die ersten Anteile des Kaolinadsorbates verworfen, nämlich 12,6% vom Invertin, die an 19,5 g Kaolin gebunden waren. Die Hauptfraktion des Enzyms, 73% vom angewandten, wurden mit 78 g Kaolin adsorbiert und mit einer Ausbeute von 59% der adsorbierten Menge durch ammoniakalisches Wasser eluiert (M.Z.Q. 5,8). Nach dem Eindampfen und der Dialyse war die Invertinmenge noch unverändert; aus dem Trockengewicht berechnete sich der Zeitwert **0,75**.

Die Invertinpräparate wurden in großer Konzentration auf Beimischungen geprüft, da bei verdünnten Lösungen alle Begleiterreaktionen versagten. Wir verwenden 1 ccm, enthaltend 3 bis 4 mg vom M.Z.Q. 0,1 bis 0,15, d. i. ebensoviel Invertin wie in 30 bis 50 ccm unserer Hefeautolysate mit 0,8 g Trockenrückstand. Von Hefegummi war keine Spur nachzuweisen. Ferner fiel die Ninhydrinprobe negativ aus oder sie war sehr schwach, dagegen war eine deutliche, freilich sehr schwache Millonsche Reaktion zu beobachten. Die Eiweißbeimischung war viel geringfügiger als vor dem Ausflocken des in die Elution mitgegangenen Kaolins und nahm noch weiter ab, als wir das [195] Invertin in neutraler Lösung, folglich mit wenig Verlust, wieder mit Kaolin behandelten.

Die beschriebene Methode läßt sich auch auf Neutralautolysat anwenden, aber in diesem Falle ist infolge der Anwesenheit großer Puffermengen die Acidität von $^{n}/_{20}$-Essigsäure für optimale Adsorptionswirkung des Kaolins nicht ausreichend. Wir fanden nämlich bei einem solchen Autolysat den Adsorptionswert in 40facher Verdünnung mit $^{n}/_{20}$-Essigsäure = 0,054, mit $^{n}/_{5}$-Essigsäure = 0,11. Aus der durch das Ammonphosphat des Autolysats abgeschwächten $^{n}/_{20}$-Essigsäure gewannen wir das Invertin mittels der Kaolinadsorption gänzlich frei von Proteinsubstanzen, aber etwas Hefegummi enthaltend. Dagegen war das aus der stärker essigsauren Lösung adsorbierte Invertin wieder frei von Hefegummi, gab auch keine Millonsche Reaktion, aber positive Ninhydrinprobe. Die Abtrennung des Hefegummis gelingt also, wenn die Flüssigkeit genügend sauer ist und die Adsorption unter solchen Bedingungen geschieht, daß sie wenig Kaolin erfordert.

III. Isolierung mit Aluminiumhydroxyd.

Die Beobachtungen über auswählende Adsorption erlauben, die Isolierung des Invertins mit Tonerde nach WILLSTÄTTER und RACKE zu verbessern. Nach den Angaben der ersten Arbeit war der Reinheitsgrad des im Aluminiumhydroxyd adsorbierten Enzyms nicht hoch (Zeitwert zwischen 7 und 20), er stieg erst beim Fällen

der Elution mit Aceton zu Werten von 3 bis 2 an. Nach dem neuen Verfahren nimmt die Tonerde zusammen mit dem Invertin nur noch so wenig von Begleitstoffen auf, daß der Trockenrückstand der dialysierten Elution fast gleichen Reinheitsgrad zeigt wie sonst erst nach dem Fällen und nochmaligen Adsorbieren mit Kaolin. Das in unserem Versuch verarbeitete Autolysat war hinsichtlich des Zeitwertes (bezogen auf Trockengewicht) nicht günstig; unsere Werte lassen sich mit besserem Ausgangsmaterial übertreffen.

Das (aus 1 Teil Hefe mit 2 Teilen Wasser) gewonnene, 10 Wochen aufbewahrte Autolysat (1,75 l; M.Z.Q. 6,35) vermischten wir zur Vorreinigung mit 700 ccm Aceton und [196] mit 175 g gewöhnlichem Kaolin und ließen die Suspension über Nacht im Eisschrank stehen. Diese Operation bedingt, wie in Abschnitt B., II. der I. Abhandlung angegeben, wechselnde und nicht unbeträchtliche Verluste. In unserem Beispiel betrugen sie 40%, denn das Filtrat vom Kaolin enthielt nur noch M.Z.Q. 3,81. Dasselbe wurde mit 34 l Wasser verdünnt und unter kräftigem Rühren mit der Suspension von 0,886 g Tonerde versetzt. Diese Menge genügte, um 95% des Invertins zu adsorbieren, woraus sich der A.W. 4,1 ergibt.

Das Tonerdeadsorbat sammelten wir in den Gläsern einer großen Zentrifuge und eluierten es nach einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser und erneutem Zentrifugieren in der von WILLSTÄTTER und RACKE (S. 96) beschriebenen Weise mit 0,1proz. Ammoniak (670 ccm). Die auf gehärteten Filtern abgesaugte, bräunlich gefärbte, klare Elution enthält eine nicht geringe Menge Tonerde. Bei vorsichtigem Ansäuern mit Essigsäure trübt sich die Flüssigkeit in dem Augenblick, wenn sie Lackmus rötet, aber Methylorange noch gelb läßt (p_H über 4). In einigen Stunden vervollständigte sich die Ausflockung des Aluminiumhydroxyds und die Flüssigkeit entfärbte sich zugleich. Die wieder filtrierte Lösung enthielt eine Ausbeute von 66% des adsorbierten Invertins (M.Z.Q. 2,38). Bei starkem Einengen im Vakuum blieb der Invertingehalt fast unversehrt (M.Z.Q. 2,30), aber bei darauffolgender dreitägiger Dialyse nahm er um 18% ab (auf 1,9 nach dem Filtrieren). Auch dabei entstand nochmals ein flockiger Niederschlag; die davon abfiltrierte Invertinlösung war geruchlos und gänzlich farblos. Ihr Trockenrückstand betrug 81,4 mg, der Zeitwert des Präparates also **0,86**. Es enthielt gar keinen Hefegummi, aber nach der Millonschen Reaktion eine deutliche Spur Eiweiß.

Zeitschrift für physiologische Chemie 133, 193 [1924].

50. ZUR KENNTNIS DES INVERTINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und KARL SCHNEIDER.

Fünfte Abhandlung.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. Oktober 1923.)

Einleitung.

Unsere Mitteilungen berichten über den Versuch, den Reinheitsgrad der Saccharase zu steigern, um Aufschlüsse über ihre chemische Eigenart vorzubereiten. Die vorliegende Arbeit behandelt eingehender als bisher die Frage, ob das Enzym zu den Eiweißkörpern zählt oder ob es uns nur vermischt mit wechselnden Mengen von ihnen begegnet. Jede analytische Frage wie diese gibt Veranlassung, die präparative Methode weiter zu entwickeln und ihre Lösung hängt ab von erneuter Steigerung der enzymatischen Konzentration oder von der Ermittlung gewisser Unterschiede einzelner Enzympräparate und -fraktionen. „Wenn man" z. B. „Invertin nach dem Stickstoffgehalt zu fraktionieren versucht, so wird der Vergleich der Enzymfraktionen wesentliche Unterschiede in den Eigenschaften und in der Reinheit auch bei ungefähr gleichem enzymatischem Reinheitsgrad ergeben"[1].

Präparate von Invertin differieren je nach der Rasse und der Beschaffenheit der verarbeiteten Hefe, nach der Art und dem Reifezustand der Autolysate, nach dem Verfahren der Isolierung und der Häufigkeit der angewandten Adsorptionsmethoden. Um zu finden, was von qualitativen Reaktionen und von den Befunden der elementaren Zusammensetzung wesentlich für die [194] Natur des Enzyms ist, wird man zweckmäßig die Darstellungsweise variieren. Leider verzichtet aber, wie wir schon früher fanden und im folgenden wieder bemerken, jede neue Isolierungsmethode auf manche zuvor erzielte Vorteile und Reinheitsmerkmale. Beispielsweise war in unserer ersten Abhandlung erreicht, Invertin von Hefegummi vollkommen zu befreien; die anders dargestellten Präparate der zweiten Abhandlung enthielten dagegen wieder etwas Kohlehydrat. Auch eine Anzahl unserer neuen Invertinpräparate weisen,

[1] III. Abh. zur Kenntnis des Invertins. Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 5.

selbst wenn sie im Reinheitsgrad den alten weit überlegen sind, deutliche Spuren von Hefegummi auf, wie aus der Tab. 17 ersichtlich. Unsere Schlußfolgerungen über die Zusammensetzung des Invertins beruhen daher nicht auf den Eigenschaften aller, sondern einzelner Präparate Wenn ein einziges hochwertiges Invertinpräparat keine Spur von Kohlehydrat enthält, so sind Kohlehydrate akzessorisch und für die Zusammensetzung des Invertins ohne Belang. Für Proteine gilt das gleiche.

Ein methodischer Fortschritt wird in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Anwendung von Kaolin zur Adsorption der Saccharase erzielt. Die Angabe von L. MICHAELIS[1], daß das Enzym von Kaolin unter keinen Umständen adsorbiert wird, mußte erst überwunden werden. Zunächst gelang dies WILLSTÄTTER und RACKE[2] nur durch vorangeschickte wesentliche Steigerung des Reinheitsgrades; erst nach der Tonerdeadsorption erschien die Adsorption von Invertin durch Kaolin ausführbar. Dann fanden WILLSTÄTTER und WASSERMANN[3], daß die störenden Einflüsse der Begleitstoffe, mit denen das Enzym assoziiert ist, durch sehr große Verdünnung bei Einstellung geeigneter Acidität ausgeschaltet werden, so daß die Saccharase unmittelbar aus den Hefeautolysaten durch Kaolin [195] auswählend adsorbiert wird. Wir gelangen einen Schritt weiter und adsorbieren einfach aus einem beliebigen Autolysat, ohne es zu verdünnen, mit Kaolin das Enzym, indem wir so stark ansäuern, als bei kürzester Operationsdauer von dem Enzym noch vertragen wird. Man kann beispielsweise mit Invertinlösungen arbeiten, die 10% Essigsäure enthalten. Je mehr es dabei gelingt, die Menge des Adsorbens herabzumindern, desto günstiger für die auswählende Adsorption, für die Reinheit des Präparates. Jenen Adsorptionswert des Kaolins (0,09), der in der IV. Abhandlung die unmittelbare Isolierung von Invertin aus dem Autolysat erlaubte, vermochten wir, wie die folgende Zusammenstellung (Tab. 1) zeigt, noch bis auf das Fünffache bei Autolysaten, auf das Zwanzigfache bei reineren Invertinlösungen zu steigern.

Die einmalige Adsorption aus Autolysaten mit Kaolin führt nun zu Invertin vom Zeitwert 0,284 [S.W. = 3,52; If = 214[1])], die Kombination mit einmaliger Adsorption durch Tonerde zum Zeitwert 0,178 (S.W. = 5,62, If = 342). Den bis heute günstigsten Reinheitsgrad besitzt ein durch Kaolin und Tonerde je einmal adsorbiertes Präparat vom Zeitwert 0,163 (S.W. = 6,14, If = 374).

Die angewandten Verfahren ermöglichen die Zerlegung des Enzyms in leichter und schwerer adsorbierbare Fraktionen und weiter die Trennung des adsorbierten Anteils in leichter und schwieriger eluierbare. Auf diese Weise wurde eine Anzahl von Invertinpräparaten zum Zwecke vergleichender qualitativer und quantitativer

[1] Biochem. Zs. Bd. 7, S. 488 [1907/08]; L. MICHAELIS und M. EHRENREICH, Biochem. Zs. Bd. 10, S. 283 [1908].

[2] I. Abh. zur Kenntnis des Invertins. Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 55.

[3] IV. Abh. zur Kenntnis des Invertins. Diese Zs. Bd. 123, S. 181 [1922].

[1]) Über die Berechnung der Inversionsfähigkeit If und über ihre Beziehung zum S.W. vergleiche den Anhang (S. 34).

Analyse in Fraktionen zerlegt. Die bisher reinsten Präparate enthalten 11,32 und 9,52% Stickstoff. Bei Präparaten vom Zeitwert 0,25 bis 0,37 schwankt der Stickstoffgehalt zwischen 10,24 und 5,41%. Die von H. v. EULER und K. JOSEPHSON aufgeworfene Frage, ob zwischen dem Stickstoffgehalt und der Inversionsfähigkeit Proportionalität besteht, ist zu verneinen[2].

[196] Tabelle 1. Adsorptionswerte von Kaolin für Saccharase.

Nr.	Alter des Autolysates	Vorbehandlung	Acidität	Verdünnung 1 S.E. in ccm	Kaolin	Adsorptionsgrad	Adsorptionswert	Zitat
1	jung od. alt	keine	—	200 u. 400	el.-osm.	0	0	IV. Abh. Tab. 2 Nr. 1 u. 3
2	4 Monate	,,	$^{n}/_{20}$-Essigs.	16000	,,	86	**0,089**	IV. ,, ,, 2 ,, 13
3	13 ,,	,,	$^{3}/_{4}$-n ,,	570	Zettlitz	92	**0,110**	V. ,, ,, 9 ,, 3
4	27 ,,	Alkoholfllg.	$^{n}/_{3}$,,	320	,,	98	**0,295**	V. ,, ,, 10 ,, 7
5	25 ,,	,,	$^{n}/_{3}$,,	1000	,,	98	**0,393**	
6	25 ,,	,,	$^{n}/_{3}$,,	2000	,,	97	**0,505**	Beisp. aus vorl. Arbeit IIe
7	Inv. v. Zeitwert 0,178		$^{n}/_{20}$,,	6000	el.-osm.	97	**1,61**	V. Abh. Tab. 6 Nr. 9.

Auch hinsichtlich der typischen Eiweißreaktionen weisen die Fraktionen große Unterschiede auf. Bei einigen der Invertinpräparate versagen die empfindlichen Eiweißproben, während sie bei andern mehr oder weniger deutlich auftreten.

Die Erkenntnis, daß die Saccharase wie andere Enzyme weder, wie angenommen, zu den Kohlehydraten noch zu den Eiweißkörpern zählt, findet also Bestätigung. Aber dies ist leider nur eine negative Aussage. Es ist noch nicht möglich, die Enzymnatur mit einer chemischen Gruppendefinition zu erklären. Freilich wäre es auch nicht angezeigt, etwa die Konstitution der schon besser bekannten Hormone oder auch nur die Natur der Alkaloide, soviel Kenntnis von der Struktur vieler einzelner leicht zugänglicher Glieder wir den chemischen Untersuchungen von hundert Jahren verdanken, mit einer zusammenfassenden chemischen Bezeichnung auszudrücken. Nur für diejenigen Klassen physiologisch wichtiger Stoffe ist es möglich, die Konstitution mit einem Worte zu erklären, die sich durch Hydrolyse in einfache Bausteine spalten lassen, also Fette, Kohlehydrate und Proteine.

Experimenteller Teil.

I. Über die Beständigkeit der Saccharase in den Adsorbaten.

Bei der Adsorption von Invertin durch Tonerde pflegt die enzymatische Wirkung quantitativ unverändert zu bleiben. Dies ist schon bei den ersten Versuchen zur Adsorptionsmethode [197] beobachtet worden[1]) und wir fanden es oft bestätigt, allerdings nur bei Präparaten von nicht sehr hohem Reinheitsgrad. Schon bei Prä-

[2] Chem. Ber. Bd. 56, S. 446 u. 1097 [1923].

[1]) R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], S. 70; R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 116, S. 59 [1921]; J. M. NELSON und D. J. HITCHCOCK, J. Am. Chem. Soc. Bd. 43, S. 1956 [1921]; R. WILLSTÄTTER, JOH. GRASER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 123, S. 52 [1922].

paraten vom Zeitwert 0,23 begegnen wir Enzymverlusten beim Adsorbieren mit Tonerde (Sorte nach WILLSTÄTTER und KRAUT[1] B, völlig sulfatfrei, und C, noch sulfathaltiges Präparat); wir finden (Tab. 2) nur 52 bis 75% derjenigen Mengen, die gemäß der Bestimmung der Restlösungen adsorbiert worden sind, im Adsorbate selbst noch in aktiver Form vorhanden. Es ist kein Anhaltspunkt dafür gegeben, daß die Enzymreaktion bei den reinen Präparaten eine Abhängigkeit vom kolloidalen Zustand zeigt, die bei weniger reinen Präparaten nicht zutage träte. Vielmehr dürfte bei der Adsorption ein Teil des Enzyms zerstört werden. Die Menge des eluierbaren Invertins steht nämlich noch zurück hinter der im Adsorbat gefundenen. Bei weitgehender Steigerung des Reinheitsgrades, bei der Beseitigung der letzten Anteile von Begleitstoffen muß man mit dieser Schwierigkeit rechnen.

Die Versuche der Tab. 2 zeigen außerdem, daß das Invertin höheren Reinheitsgrades, wohl infolge der Verarmung [198] an Phosphat, aus den Adsorbaten schwerer durch Ammoniak als durch das spezifisch eluierende Alkaliphosphat[1]) freigelegt wird.

Tabelle 2. Invertinverlust bei der Tonerdeadsorption.

Nr.	Invertin	Tonerde	Im Adsorb. gef. Inv., Proz. d. ads. Menge	Eluiertes Invertin: Proz. von adsorbiertem, mit 0,05% Ammoniak	Eluiertes Invertin: Proz. von adsorbiertem, mit 0,5% Diammonphosphat	Eluiertes Invertin: Proz. von im Ads. best., mit 0,05% Ammoniak	Eluiertes Invertin: Proz. von im Ads. best., mit 0,5% Diammonphosphat
1	S.W. 4,35	Sorte C	52	1	48	2	92
2	S.W. 4,35	Sorte B	75	43	62	57	83
3	S.W. 5,71	Sorte B	71	37	60	52	85

Das Verhalten des Invertins gegen Kaolin ist verschieden von der Konstanz, die bis zu hohen Reinheitsgraden bei der Adsorption an Tonerde besteht. Man wird an die eigentümlichen Verluste von Peroxydase erinnert, die in dem besonderen Falle der Adsorption durch kolloide Kieselsäure bemerkt wurden[2]). Bei der Verarbeitung von frischen, aber von viel Eiweiß befreiten Hefeautolysaten konnten nämlich in den Versuchen der Tab. 3 nach Adsorption mit elektroosmotisch gereinigtem Kaolin bei geeigneter Acidität der Lösung (Konzentration 1 S.E. in 8 bis 16 l) nur $^1/_5$ bis $^2/_5$ des adsorbierten Enzyms durch Elution mit Ammoniak oder Alkaliphosphat isoliert werden. Wie in der IV. Abhandlung gezeigt, wird Invertin aus frischen Hefeautolysaten von Kaolin nur in sehr geringem Maße adsorbiert. Die Adsorbierbarkeit steigt nun sogar zu hohen Werten an bei einer Vorbehandlung der Autolysate mit Eiweiß fällenden Schwermetallsalzen (mit basischem Ferrisulfat), wobei dem Invertin viel Hefegummi beigemischt bleibt. Für die folgenden Versuche (auch die der Tab. 4) [199] diente ein solches, durch Vorreinigung auf den Zeitwert 10,9 gebrachtes, frisches Hefeautolysat.

[1] Chem. Ber. Bd. 56, S. 149 u. 1117 [1923].
[1]) R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 116, S. 59 [1921] (*Abh. 47*).
[2]) R. WILLSTÄTTER, Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 422, 47 [1920/21], und zwar S. 86.

Tabelle 3. Adsorption mit (el.-osm.) Kaolin und Elutionsausbeute.

Nr.	essigsauer	Kaolin g	Adsorbierte S.E.	Adsorptionsgrad	Elution	Eluiertes Invertin, Proz. vom adsorb.
1	n/20	2	0,129	100	0,05 % Ammoniak	18,7
2	n/20	1	0,132	100	schwach soda-alkalisch	15,9
3	n/20	0,5	0,118	100	1 % Diammonphosphat + 1 ‰ Glycerin	24,6
4	n/20	0,25	0,096	92	1 % Diammonphosphat + 1 ‰ Glycerin, 150 Min. bei 30°	34,4
5	n/50	0,5	0,094	84	10 ccm 0,05 % Ammoniak + 10 ccm 0,5 % prim. Phosphat	32,5
6	n/50	1,5	0,162	96	6 ccm 0,05 % Ammoniak + 10 ccm 0,5 % prim. Phosphat	25
7	n/50	3	0,220	93	10 ccm 0,05 % Ammoniak + 7,5 ccm 0,5 % prim. Phosphat	32,3
8	n/50	1,5	0,132	94	0,5 % Diammonphosphat + 1 ‰ Glycerin, 360 Minuten	24,2

Die Ausbeuten in den Elutionen waren bei Kaolinen von verschiedener Herkunft und Beschaffenheit ungünstig. Sie ließen sich aber verbessern (Tab. 4), wenn die Kaoline der von Willstätter und Racke[1] empfohlenen Behandlung mit siedender 20proz. Salzsäure unterzogen wurden; sei es, daß man das Adsorbens noch auf Lackmus scharf sauer reagierend anwandte oder daß man es mit Ammoniak neutralisierte. Es genügt nicht (Versuch 5 und 6 der Tab. 4), das Kaolin mit verdünnter Salzsäure nur zu schütteln. Am günstigsten war aber (Versuch 11 und 12 der Tab. 4) für die Verarbeitung vorbehandelter, frischer Autolysate oder von Invertinlösungen höheren Reinheitsgrades eine sehr weitgehende [200] Vorbehandlung der Kaoline mit heißer, konzentrierter Salzsäure, die eine beträchtliche Zersetzung des Tonerdesilicats und eine gewisse Beladung mit Chlorwasserstoff zur Folge hatte.

Tabelle 4. Kaolinbeschaffenheit und Elutionsausbeute.
(Adsorption aus n/20-essigsaurer Lösung von 1 S.E. in 8 l, Elution durch 0,05 % NH_3.)

Nr.	Kaolin	Adsorbierte S.E.	Adsorptionsgrad	A.W.	Eluiertes Invertin, Proz. vom adsorb.
1	Kahlbaum	0,116	85	0,232	22,4
2	Zettlitz	0,130	96	0,260	21,8
3	el.-osm.	0,115	94	0,230	38,3
4	el.-osm.	0,129	100	—	18,7
5	mit 0,1 % HCl beh.	0,120	86	0,240	31,7
6	mit 1 % HCl beh.	0,115	84	0,231	24
7	mit 20 % HCl beh.	0,123	95	0,246	50,5
8	mit 20 % HCl beh.	0,107	98	0,226	58,4
9	ebenso, mit NH_3 neutr.	0,094	78	0,188	49
10	ebenso, mit NH_3 neutr.	0,117	87	0,213	47,5
11	mit konz. HCl beh.	1,401	95	0,211	75,1
12	mit konz. HCl beh.	4,830	92	0,242	79,8

500 g Kaolin wurden mit 1,5 l reiner Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,18 gut vermischt und erwärmt, zunächst so langsam, daß es einen Tag bis zum beginnenden Kochen dauerte, dann einen weiteren Tag zum lebhaften Sieden. Durch Verdünnen und wiederholtes Dekantieren mit Wasser trennte man die eisenhaltige Lösung vom Kaolin ab und wiederholte noch dreimal diese Behandlung mit Salzsäure, so daß im ganzen 14 Tage dafür nötig waren. Schließlich wurde das Kaolin für alle Versuche in dieser Arbeit mit kaltem Wasser nur soweit ausgewaschen, daß das

[1] R. Willstätter und F. Racke, Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 86.

Wasser fast keine saure Reaktion mehr zeigte, während aber eine kleine Probe des Kaolins auf Lackmuspapier noch stark saure Reaktion aufwies.

Die folgenden Analysen geben einen Vergleich zwischen dem angewandten (elektro-osmotischen) und dem mit Salzsäure erhitzten Kaolin.

Elektro-osmotisches Kaolin: 0,4153 g Substanz (bei 120° getrocknet) gaben 0,2172 g SiO_2, 0,1476 g $Al_2O_3 + Fe_2O_3$, 0,0058 g Fe_2O_3, 0,0071 g CaO. — 0,4306 g Substanz gaben 0,2253 g SiO_2, 0,1536 g $A_2lO_3 + Fe_2O_3$.

Salzsäure-behandeltes Kaolin: 0,3888 g Substanz (bei 120° getrocknet) gaben 0,2302 g SiO_2, 0,1163 g $Al_2O_3 + Fe_2O_3$, 0,0016 g Fe_2O_3, [201] 0,0031 g CaO. — 0,4099 g Substanz gaben 0,2440 g SiO_2, 0,1242 g $Al_2O_3 + Fe_2O_3$, 0,0021 g Fe_2O_3.

	El.-osm.		Salzs.-beh.	
Gef.	I	II	I	II
SiO_2	52,30	52,32	59,35	59,52
$Al_2O_3 + Fe_2O_3$	35,54	35,67	29,92	30,30
Fe_2O_3	1,39	—	0,41	0,45
CaO	1,71	—	0,79	–

Bei den gealterten, aber keinen Reinigungsoperationen unterworfenen Autolysaten, wie sie für das Verfahren der Invertindarstellung von WILLSTÄTTER und WASSERMANN dienen, hat die Beschaffenheit des Kaolins sehr wenig Einfluß; die verschiedenen Sorten (Tab. 5) geben auch ohne Vorbehandlung mit Salzsäure bei der Adsorption und Elution hohe Ausbeuten. Dieses Ergebnis ist, wie aus dem Vergleich mit den voranstehenden und den nachfolgenden Versuchen hervorgeht, auf den Gehalt der Autolysate an Proteinsubstanzen zurückzuführen, die eine Schutzwirkung ausüben.

Tabelle 5. Elutionsausbeuten bei gealterten Autolysaten.
($^n/_{20}$-essigsaure Lösung, 1 S.E. in 8 l; eluiert durch 0,05% NH_3.)

Nr.	Kaolin	Adsorbierte S.E.	Adsorptionsgrad	A.W.	Eluiertes Invertin, Proz. vom adsorb.
1	el.-osm.	0,1116	91	0,112	70,5
2	Zettlitz	0,1183	96	0,118	78
3	mit 20% HCl beh.	0,121	99	0,101	82,5
4	mit konz. HCl beh.	0,0644	52	0,128	65

Der Adsorptionswert des Kaolins für Invertin in $^n/_{20}$-essigsaurer Lösung steigt beim Altern der Autolysate von ungefähr 0,008 auf 0,06 bis 0,12; bei der Reinigung des Invertins nach den beschriebenen Methoden zum Zeitwert von etwa 0,2 wächst der Adsorptionswert infolge der Verarmung der Invertinlösung an Begleitstoffen, welche die Oberfläche des Kaolins mit beanspruchen, weiter zum 10- bis 20fachen, nämlich [202] zum Werte 1,6 bis 1,7. Gemäß diesem größeren Adsorptionsvermögen sollte es möglich sein, reinere Präparate durch Adsorptions- und Elutionsvornahmen zu erhalten. Allein dieser Versuch gelingt mit Kaolin nicht. Reinere Invertinpräparate ergeben nämlich bei der Kaolinadsorption und -elution große Verluste. Die Versuche der Tab. 4 sind in $^n/_{20}$-essigsaurer Lösung, d. i. bei einer Acidität, die in der Versuchsdauer ohne Zersetzung ertragen wird, mit Invertin vom Zeitwert 1,3, 0,23 und 0,178 ausgeführt; in dem letzten Beispiel betrug die Elutionsausbeute bei Anwendung von el.-osm. Kaolin nur 15, von salzsäure-behandeltem Kaolin nur 30%.

Tabelle 6. Adsorption von reinerem Invertin und Elutionsausbeute.
(Eluiert mit 0,5 % Diammonphosphat.)

Nr.	Präparat	Kaolin	Adsorbierte S.E.	Adsorptionsgrad	A.W.	Eluiertes Invertin, Proz. vom adsorb.
1	S.W. 0,77	el.-osm.	0,104	95	0,208	37,5
2	„ 0,77	Zettlitz	0,104	95	0,208	37,5
3	„ 0,77	mit 20 % HCl beh.	0,107	98	0,214	58,4
4	„ 0,77	mit konz. HCl beh.	0,105	96	0,210	57,7
5	„ 4,35	el.-osm.	0,112	100	—	13
6	„ 4,35	Zettlitz	0,112	100	—	23,7
7	„ 4,35	mit 20 % HCl beh.	0,112	100	—	36,9
8	„ 4,35	mit konz. HCl beh.	0,112	100	—	39,3
9	„ 5,71	el.-osm.	0,161	97	1,61	15,2
10	„ 5,71	mit 20 % HCl beh.	0,157	95	1,57	36
11	„ 5,71	ebenso mit NH_3 neutr.	0,132	80	1,65	20,5
12	„ 5,71	mit konz. HCl beh.	0,162	98	1,62	37,7

Die einerseits bei den frischen, durch Ausfällung von Eiweiß befreiten Autolysaten, sodann bei Invertin von höherem Reinheitsgrad beobachteten Enzymverluste können entweder darauf beruhen, daß die Adsorbate schlecht eluierbar sind, oder darauf, daß das Invertin bei der Adsorption, sei es sofort oder allmählich, zerstört wird. Die Kaolinrückstände nach der [203] Elution sind indessen so arm an Invertin, daß die beobachteten Differenzen nicht mit Zurückbleiben des Enzyms im Kaolin erklärt werden können.

Zum Beispiel erzielten wir nach der Adsorption von 0,109 S.E. aus 2 l $^n/_{20}$-Essigsäure mit 1 g el.-osm. Kaolin eine Elutionsausbeute von 27 % und fanden in dem einmal eluierten Kaolin nur eine geringfügige Menge (0,3 %) vom Invertin.

Unsere Beobachtungen ergeben nun, daß bei der Adsorption durch Kaolin — in geringerem Maße durch salzsäure-behandeltes — teilweise Zerstörung des Invertins erfolgt und zwar sofort.

In 1 l $^n/_{20}$-essigsaurer Lösung von 0,253 S.E. des für Tab. 3 angewandten Invertins wurden 1,14 g el.-osm. Kaolin eingetragen, d. i. soviel, als zur Adsorption erforderlich. Darauf wurde so schnell als möglich mit dieser Suspension die Saccharasewirkung bestimmt, und zwar mit 40 ccm; unter den Bedingungen der Vergleichszeitwertsbestimmung erfolgte halbe Inversion in 79,5 Min. Daraus ergab sich für die ganze Aufschlämmung der Gehalt von 0,0728 S.E., d. i. 28,6 % des angewandten Enzyms.

Die direkte Bestimmung der Saccharasewirkung von Kaolinadsorbaten (Tab. 7) ergab bei Anwendung von reinem und weniger reinem Invertin, daß die Adsorbate stets soviel und nicht mehr Saccharase enthielten, als wir daraus zu eluieren vermochten. Die in den Elutionen fehlende Saccharase fehlte schon alsbald nach der Adsorption. Man hat keinen Grund, Hemmung der Invertinwirkung im Adsorbat, wie sie bei den Bleifällungen von Willstätter, Graser und Kuhn[1] beschrieben wurde, hier anzunehmen. Das Adsorbat wies nie weniger Enzym auf als die Elution. Es ist kein Anzeichen gegeben, daß mehr Enzym eluierbar ist, als in der Adsorbatanalyse gefunden wird. Das Enzym hat also von einem gewissen Reinheitszustand

[1] Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 15. In den Bleifällungen findet man beispielsweise nur 10 bis 17 % des wirklichen Invertingehalts, von dem 86 % eluiert werden konnten.

an bei der Adsorption teilweise Zersetzung erlitten, in höherem Maße bei reinem Kaolin und bei [204] reinerem Invertin, in geringerem Maße bei salzsäure-behandeltem Kaolin und bei unreinem Invertin.

Tabelle 7. Vergleichende Bestimmung in Kaolin-adsorbaten und Elutionen.

Nr.	Invertin	Kaolin	Im Adsorbat gef. Invertin, Proz. des adsorbierten	Eluiertes Invertin	
				Proz. vom adsorbierten	Proz. des im Adsorbat bestimmten
1	junges, enteiw. Autolysat	el.-osm.	42,5	32 ; 38	75 ; 89,5
2		mit 20% HCl beh.	64,7	51 ; 59 ; 57	79 ; 91 ; 88
3		mit 20% HCl beh.	64,2	65 ; 53	100 ; 82,5
4		mit konz. HCl beh.	73,5	68,5	93
5	gealt. Autolysat	el.-osm.	74,3	74,5	100
6	S.W. 0,763	el.-osm.	44	37,5 ; 36,2	85 ; 82
7	„ 0,763	mit 20% HCl beh.	58,5	58,4 ; 57,7	100 ; 98,5
8	„ 4,35	el.-osm.	13	13	100
9	„ 4,35	mit konz. HCl beh.	39,9	39,3	98,5
10	„ 5,62	el.-osm.	15,2	15,2	100
11	„ 5,62	wie 7, neutr. mit NH_3 . . .	26,2	20,5	78

Die bei der Adsorption sofort erfolgende Invertinzerstörung schreitet nur langsam im Adsorbat weiter.

Aus vorgereinigtem frischem Hefeautolysat, enthaltend 0,0973 S.E., wurde bei einem Essigsäuregehalt = $^n/_{50}$ das Adsorbat mit 0,5 g Kaolin (mit konz. Salzsäure behandelt) bereitet, rasch abgesaugt und in Wasser aufgeschlämmt. Das Adsorbat enthielt, sofort bestimmt, 0,0680 S.E., d. i. 70,8%, nach 1 Stunde 0,0627 S.E., d. i. 64,5%, nach 5 Stunden 0,0593 S.E., d. i. 60,9% der angewandten Saccharase; eine andere Probe, nach dem Absaugen in $^n/_{50}$-Essigsäure suspendiert, wies nach 1 Stunde 0,0606 S.E., d. i. 62,2%, auf.

II. Zur Isolierung des Invertins durch Adsorption mit Kaolin.

A. Aus unverdünnten, stark angesäuerten Autolysaten.

Auf die Adsorption des Invertins aus den Hefeauszügen üben nach Willstätter und Wassermann die Verdünnung, die Alterung der Autolysate und ihre Acidität wesentlichen [205] Einfluß aus. Es gelingt durch Verminderung der Zeitspanne, während deren das Enzym der Säurewirkung unterliegt, nämlich durch Abkürzung der Operationen, die anwendbare Acidität bedeutend zu steigern. Dadurch wurde zwar bei frischen Autolysaten keine, bei gealterten aber eine wesentliche Steigerung der Adsorptionswirkung von Kaolin erzielt, nämlich eine ebenso bedeutende wie durch die von Willstätter und Wassermann eingeführte große Verdünnung.

Die Säureempfindlichkeit des Invertins ist zuerst von C. S. Hudson und H. S. Paine[1] untersucht worden. Gegenüber den älteren Befunden ist die Abhängigkeit des Verhaltens vom Reinheitszustand hervorzuheben. Es ist nach den Untersuchungen der Tab. 8 bei den an Schutzstoffen reichen Autolysaten möglich, die Säure auf erstaunlich hohe Konzentration zu steigern, ohne daß in der für die Operation unbedingt erforderlichen Zeit Enzymverlust vorkommt. Aber verhältnismäßig sehr

[1] Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 32, S. 774 u. 985 u. 1220 [1910].

geringen Differenzen der Titrationsacidität entsprechen entscheidende Unterschiede in der zerstörenden Wirkung. Nach den Versuchen 5 und 6 wird vom Invertin eines Autolysates $^{n}/_{6}$-Salzsäure 22 Minuten mit nur 3,6% Verlust ertragen, während in $^{n}/_{4}$-salzsaurer Lösung unter gleichen Umständen schon 71,5% zerstört werden. 1,5n-Essigsäure (also Autolysat, auf einen Gehalt von 9% Essigsäure gebracht) bewirkt in 12 Minuten keine Abnahme, 2n-Essigsäure hingegen eine Minderung des Invertingehalts um 17% (Versuch 2 und 3). In dem beträchtlich reineren Zustand, in den das Invertin durch Fällung eines Autolysates mit Alkohol und Auflösen des Niederschlages mit Wasser oder Alkohol gelangt, bleibt das Enzym noch in $^{n}/_{3}$-essigsaurer Lösung während 15 Minuten unversehrt.

Unter den so ermittelten Aciditätsbedingungen, also in $^{n}/_{8}$-Salzsäure oder zumeist in 1,5n-Essigsäure, behandelten wir genügend gealterte Autolysate, ohne sie zu verdünnen, mit Kaolin. Es war dafür unnötig, das Kaolin mit Salzsäure zu behandeln. Der Adsorptionswert (0,1) und die Elutionsausbeute (70 bis 90%)

[206] Tabelle 8. Beständigkeit von Invertin geringerer Reinheitsgrade gegen Säure.

Nr.	Alter des Autolysates	Vorbehandlung	Acidität	Dauer der Einw. in Minuten	Saccharasegehalt vor der Säureeinw.	Saccharasegehalt nach der Säureeinw.	Verlust in Proz.
1	13 Mon.	keine	1 n-Essigsäure	12	0,1104	0,1098	0,5
2	13 ,,	,,	1,5 n- ,,	12	0,1104	0,1100	0,3
3	13 ,,	,,	2 n- ,,	12	0,1104	0,0913	17,3
4	13 ,,	,,	n/8-Salzsäure	18	0,0625	0,0635	1,5
5	13 ,,	,,	n/6- ,,	18	0,0444	0,0428	3,6
6	13 ,,	,,	n/4- ,,	22	0,0663	0,0189	71,5
7	13 ,,	,,	n/2- ,,	22	0,0444	0,0000	100
8	27 ,,	Kaolin mit Aceton	3/4 n-Essigsäure	19	0,0565	0,0559	1
9	27 ,,	,, ,, ,,	1,5 n- ,,	19	0,0565	0,0040	92,8
10	27 ,,	Alkoholfällung gel. in Wasser	n/3- ,,	15	0,0405	0,0407	1
11	27 ,,		n/2- ,,	15	0,0405	0,0378	6,7
12	27 ,,		3/4 n- ,,	15	0,0405	0,0359	11,4
13	11 1/2 ,,	Alk.-Fllg. gel. in 0,06% Ammoniak	3/4 n- ,,	24	0,0778	0,0754	3
14	11 1/2 ,,		1 n- ,,	24	0,0778	0,0708	9
15	Invertin von S.W. 3,52		n/20- ,,	105	0,0451	0,0455	1
16			n/10- ,,	105	0,0451	0,0427	5,4
17			n/5- ,,	105	0,0451	0,0409	9,3

Tabelle 9. Adsorption aus unverdünntem, stark angesäuertem Autolysat.
Angewandt 13 Mon. altes Autolysat ohne Vorbehandlung.

Nr.	Acidität	Verdünnung 1 S.E. in ccm	Kaolin	Adsorbierte S.E.	Adsorptionsgrad	A.W.	Elutionsausbeute
1	n/10-Essigsäure	470	Zettlitz	0,081	30	0,029	—
2	1 n- ,,	420	,,	0,0819	74	0,089	92
3	1,5 n- ,,	570	,,	0,1013	92	0,11	70
4	1 n- ,,	390	mit konz. Salzs. beh.	0,0702	64	0,076	82
5	1,5 n- ,,	600	,,	0,0900	82	0,098	79
6	n/8-Salzsäure	350	Zettlitz	0,0937	85	0,102	82
7	n/6- ,,	370	,,	0,1007	91	0,109	—

[207] waren bei Zettlitzer Kaolin ebenso günstig als bei mit Salzsäure behandeltem. Die Dauer dieser Versuche (Tab. 9) bis zur Neutralisation der zu analysierenden, vom Adsorbat mittels gehärteter Filter abgesaugten Restlösungen betrug höchstens 10 Minuten.

Dieses Verfahren ließ sich nicht auf ein frisches Hefeautolysat übertragen. 6 Tage nach dem Einleiten der Hefeautolyse brachten wir von der gebildeten Invertinlösung 88 ccm mit 0,252 S.E. auf den Gehalt von 1,5 n-Essigsäure (Verdünnung 1 S.E. in 350 ccm) und behandelten sie mit 2,52 g Kaolin. Die Adsorption belief sich nur auf 25,8% vom Invertin, entsprechend dem Adsorptionswert 0,026.

Es sind aber ebenso wie für das Verfahren der Bleifällung von WILLSTÄTTER, GRASER und KUHN[1] auch nicht alle gealterten Autolysate ohne Vorreinigung, unverdünnt und bei starkem Säuregehalt gut anwendbar befunden worden. Die proteolytischen und vielleicht auch andere enzymatische Vorgänge in den reifenden Autolysaten sind von der Beschaffenheit der verarbeiteten Hefe, der Acidität, der Temperatur und anderen Einflüssen abhängig und nehmen keinen konstanten Verlauf. Mit dieser Einschränkung ist die Isolierung durch Kaolin aus stark essigsaurer, konzentrierter Lösung so günstig wie die Adsorption bei großer Verdünnung. Man erspart die Bewältigung der ausnehmend großen Flüssigkeitsmengen und kommt in einer Operation zu etwa demselben Reinheitsgrad.

Acetonzusatz zum Autolysat (Gehalt 28%) oder Vorreinigung mit Kaolin in neutraler acetonhaltiger Lösung hat auf diese Adsorption mit Kaolin die Wirkung, daß schon mit $^3/_4$ n-essigsaurer Flüssigkeit der Adsorptionswert 0,1 erreicht wird und daß der Reinheitsgrad der Elutionen noch etwas günstiger ausfällt.

Beispiel.

Das Autolysat, 13 Monate alt, enthielt im Liter 4,4 E., die zur Adsorption 44 g Kaolin erforderten. Seine Aufschlämmung (400 ccm) wurde mit gleich viel 3 n-Essigsäure [208] vermischt, ebenso 1 l Autolysat, indem man die 3 n-Essigsäure durch den Frankensteinschen Rührer zufließen ließ, durch den auch sogleich das Kaolin eingetragen wurde. Nach dem Umschütteln wurde rasch das Adsorbat auf der bereitstehenden, mit Koliertuch und doppelter Lage Filtrierpapier bedeckten, breiten Steinzeugnutsche abgesaugt und mit 2 l Wasser sorgfältig nachgewaschen. Um in der Restlösung nachher den Invertingehalt zu finden, muß man das Filtrat sofort neutralisieren. Die Elution, mit 1,4 l 0,06 proz. Ammoniak während 10 Minuten bereitet, filtrierten wir durch eine dünne Kieselgurhaut auf gehärtetem Filter ab.

In der Restlösung blieben 0,385 S.E. Das Kaolin hat also mit einem Adsorptionswert von 0,094 gewirkt; eluiert waren 3,12 E., d. i. 76% der adsorbierten Menge. Die Elution war hellbräunlich; nach schwachem Ansäuern zu $p_H = 3{,}5$ bis 4 flockte über Nacht etwas in Lösung gegangenes Silicat aus und nahm die färbende Beimischung zum größten Teil mit. Beim Einengen des Filtrates im Vakuum ging der

[1] Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 19.

Enzymgehalt ein wenig zurück (auf 3,08 E.). Nach der Elektrodialyse, die mit 8% Verlust stattfand, war der S.W. 1,64 (Zeitwert 0,61).

Dialyse und Elektrodialyse.

Für die Dialyse fanden wie früher Hülsen aus Kollodium und aus sog. Fischblasen Verwendung. Die ersteren waren unzuverlässiger, die Enzymverluste durch Hinausdiffundieren bei dünnen Kollodiumhäuten groß, während bei dicker Kollodiumschicht der Dialysator zu langsam wirkte. Auch kam es vor, daß die Durchlässigkeit der Kollodiumhaut für Elektrolyte sich während der Dialyse stark verringerte. Geeigneter waren bei strenger Auswahl, vorsichtiger Behandlung und ständiger Kontrolle doch die Hülsen aus tierischem Material, die sog. Fischblasen. Man kann die in der III. Abhandlung angezeigte Gefahr vermeiden, daß die Proteinsubstanz dieser Häute Zersetzungen unterliegt und stickstoffhaltige Abbauprodukte an die Enzymlösung abgibt.

Die Abgabe von Stickstoffverbindungen prüften wir mit einer reinen Lösung von β-Amylose und zwar von 65 mg in **[209]** 100 ccm. Sie wurde in einer für Invertin schon verwendeten Fischblase zwölftägiger Dialyse unter Einleiten von Kohlensäure unterworfen und noch einer dreistündigen Elektrodialyse unter Anwendung von Membranen aus dem nämlichen Material. Die β-Amylose nahm bei diesen Operationen keinen Stickstoff auf.

1. Analyse der Amylose vor der Dialyse.

7,054 mg gaben bei der Mikro-Dumas-Bestimmung nach PREGL weniger als 0,018 ccm Stickstoff, entsprechend einem Stickstoffgehalt von weniger als 0,2%.

2. Analyse nach der Dialyse.

16,615 mg gaben weniger als 0,020 ccm Stickstoff, entsprechend einem Stickstoffgehalt von weniger als 0,1%.

Unsere älteren Präparate lieferten wechselnde, mitunter sehr hohe Aschenzahlen; unsere reineren letzten Darstellungen gaben nach der Dialyse einen Glührückstand von 1 bis 1,5%. Auch H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] finden nach der Dialyse sogar mit saurer Außenflüssigkeit noch 2,86% Asche.

Den Untersuchungen von W. PAULI[2] verdanken wir in erster Linie die Anregung und die Methode zur Elektrodialyse, die es ermöglicht, adsorptiv festgehaltene, hartnäckig anhaftende Ionen zu entfernen und die Aschengehalte des Invertins auf 0,50 bis 0,25% herabzumindern. Mit zunehmender Verarmung der Lösung an Elektrolyten fallen auch die mit dem Invertin kolloidal gelöst gehaltenen Adsorbensteilchen vollkommen aus, so daß sie sich durch Filtration leicht beseitigen lassen. Bei Invertin von geringerem Reinheitswert (S.W. 1,2 bis 1,7) ließ sich der Reinheitsgrad allein durch Elektrodialyse nicht unbeträchtlich steigern, indem dadurch außer festgehaltenem Adsorbens auch organische Kolloide zur Ausflockung gebracht werden. Das Invertin, auch im reinsten bisher zugänglichen Zustand, zeigt sich gegen die

[1] Chem. Ber. Bd. 56, S. 433 [1923], und zwar S. 454.

[2] Koll. Zs. Bd. 28, 2, S. 49 [1921] und Anzeiger der Wiener Ak. d. Wiss., Sitz. d. math.-naturwiss. Kl. vom 25. Jan. 1923.

Einwirkung des Stromes beständig, so daß bei einer Dauer von einigen Stunden die Elektrodialyse ohne erheblichen Verlust verläuft. Erst bei langer Dauer kommen [210] beträchtliche Verluste vor. Es war am besten, auch um Erhitzung bei anfangs hohem Elektrolytgehalt zu vermeiden, der Elektrodialyse die gewöhnliche Dialyse mit 1 bis 2 Tagen Dauer bei ammoniakalischen Lösungen, mit 3- bis 4tägiger bei phosphathaltigen voranzuschicken. Die Verluste bei der Elektrodialyse unter Anwendung unserer sog. Fischblasenmembran betrug dann nur einige, höchstens 10%.

B. Nach Fällung mit Alkohol Adsorption aus stark angesäuerter Lösung.

Für die direkte Adsorption des Invertins mit Kaolin ist eine Vorreinigung bei jungen Autolysaten unentbehrlich, bei gealterten nicht notwendig. Auch für die letzteren kann aber eine Vorreinigung vorteilhaft sein; sie läßt sich nämlich so ausgestalten, daß danach eine einzige Kaolinadsorption zu Invertin vom S.W. 3,06 (M.W. 0,325) führt. Ein vollkommener Ausgleich zwischen jungen und gereiften Autolysaten ist durch die Vorreinigung noch nicht erzielt worden. Die Präparate aus vorgereinigten frischen Autolysaten stehen hinter denjenigen aus gealterten bei gleichen Adsorptionsvornahmen im Reinheitsgrad immer zurück.

Ein gutes Verfahren für die Vorreinigung verdanken wir den Arbeiten von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1]. Die früher von C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON[2] ausgearbeitete Fällung der Hefeauszüge durch Alkohol wurde von EULER und JOSEPHSON als Vorbehandlung für die Reinigung des Enzyms mittels der Tonerde-Kaolinadsorption eingeführt. Das Autolysat wurde mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt und der Niederschlag 30 Stunden mit Wasser digeriert. Das Invertin der gebildeten Auflösungen (für die Präparate VIIIa, IXa, Xa, XIa und XIIa aus den Werten von If berechnet) entsprach den Zeitwerten 22, 8,5, 16,2, 21 und 17,3. Dank dieser [211] Vorreinigung gelang es v. EULER und JOSEPHSON[1]), schon auf Autolysensaft ohne Alterung die Adsorptionsmethode anzuwenden, aber auch die Stockholmer Forscher bezeichnen das Verfahren unter Verwendung von gealtertem Autolysat nach WILLSTÄTTER und WASSERMANN als bedeutend einfacher. Die so gewonnenen Präparate[2]) VIIIa AKAK, IXa AKA, Xa AA, XIa AAKA, XIIa AKA, sind gekennzeichnet durch If = 102, 225, 190, 217, 230[3]), d. i. durch die Zeitwerte 0,60, 0,27, 0,32, 0,28, 0,265.

In unseren Versuchen bestanden die bei einem Gehalt von 50% Alkohol rasch gebildeten Fällungen hauptsächlich aus Hefegummi und Phosphat, vermischt mit

[1] Chem. Ber. Bd. 56, S. 446 u. 453 u. 1097 [1923].

[2] Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 [1890], und zwar S. 875; vgl. ferner H. v. EULER, E. LINDBERG und K. MELANDER, Diese Zs. Bd. 69, S. 152 [1910]; H. v. EULER und S. KULLBERG, Diese Zs. Bd. 73, S. 335 [1911]; H. v. EULER und O. SVANBERG, Diese Zs. Bd. 107, S. 269 [1919.]

[1]) Chem. Ber. Bd. 56, S. 446 [1923].

[2]) Die Zeichen bedeuten die Reinigung; a durch Alkohol, A durch Tonerdeadsorption, K durch Kaolinadsorption.

[3]) Vgl. Anhang.

Verbindungen der Proteingruppe, nämlich bei frischen Autolysaten mit einer reichlichen Menge von wenig denaturierten Proteinen, bei gealterten mit einer spärlichen Menge von abgebauten Eiweißsubstanzen. Der Niederschlag aus frischen Autolysaten enthielt alles Invertin und er gab an Wasser sofort 80 bis 90 % des in Form von Autolysat angewandten Invertins ab. Weniger vollständig fällt das Enzym aus den gealterten Autolysaten mit nieder; es kam vor, daß in der Restlösung noch 17 % des Invertins blieben. Der mit der Zentrifuge rasch isolierte Niederschlag gab das Enzym leichter und sehr schnell an 0,06 proz. Ammoniak ab, nämlich 76, 77 und 78 % der im Autolysat angewandten Menge.

Für die Isolierung des Invertins nach dieser Vorreinigung ist die beste Methode die Adsorption mit Kaolin, wodurch, wie bekannt, Hefegummi so leicht und vollständig abgetrennt wird, und zwar ist es die Adsorption bei einer möglichst hohen Acidität, wie sie bei kürzester Operationszeit eben noch ertragen wird. Es gelang bei der Verwendung frischer Autolysate, wofür einige unserer Beispiele in der Tab. 10 angeführt werden, die aus den Alkoholfällungen gewonnenen Auflösungen 0,75- bis 1,5 n-essigsauer zu verarbeiten und Adsorptionswerte des Kaolins von 0,07 bis 0,1 zu erzielen. Bei gealterten Autolysaten [212] als Ausgangsmaterial (Nr. 3 bis 7 der Tab. 10) ist n/3- bis 3/4 n-Essigsäure erträglich und nötig, und der Adsorptionswert steigt hier auf sehr hohe Werte (0,2 bis 0,3). Für das Invertin der frischen Autolysate, aber nur für diese, bot mit Salzsäure behandeltes Kaolin den Vorteil höherer Elutionsausbeute.

Tabelle 10. Isolierung (nach Alkoholfällung) mit Kaolin bei hoher Acidität.

Nr.	Alter des Autolysates	Angewandte S.E.	Elutionsausbeute aus Alk. Fllg.	Verdünnung von 1 S.E. und Acidität	Kaolin Sorte und Menge	Adsorbierte S.E.	A.W. bei Ads.-Grad 95—100	Elutionsausbeute in Proz.	Ausbeute nach Dialyse in Proz. des Ausgangsmat.	Ausbeute nach Dialyse in Proz. der El.-Ausb. aus Alk. Fllg.	S.W. des fertigen Präparates
1	8 Tage	28,60	94	185 1,5 n-Essigs.	384 g } mit konz.	25,60	0,067	76	54,5	58,2	1,18
2	15 ,,	7,08	88	204 3/4 n- ,,	56,5 g } Salzs. beh.	5,90	0,104	96	72,0	82,0	1,11
3	8 Mon.	100,00	76	194 3/4 n- ,,	280 g Zettlitz	71,20	0,254	71	—	—	—
4	12 ,,	38,20	87	198 3/4 n- ,,	112 g ,,	32,10	0,286	80	—	—	—
5	27 ,,	15,00	38	415 n/3- ,,	28 g ,,	5,70	0,200	83	25,4	66,2	3,06
6	27 ,,	5,30	45	395 n/3- ,,	10 g ,,	2,35	0,235	84	26,3	58,8	2,60
7	27 ,,	10,00	76	320 n/3- ,,	25 g ,,	7,50	0,300	82	55,1	72,4	2,64

Die Tab. 10 gibt einige Beispiele von der Anwendung dieses Verfahrens und den erzielten Reinheitsgraden, den Zeitwerten 0,33 bis 0,39 bei gealterten, 0,80 bis 0,90 bei jungen Autolysaten. Der Arbeitsgang sei erläutert an einem

Beispiel (Nr. 5 der Tab. 10):

Von einem 27 Monate alten Autolysat aus Löwenbräuhefe wurden 3 l, 15 S.E. enthaltend, verarbeitet und literweise bei 0° mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag war zäh und wenig voluminös; rasch in der Klärzentrifuge abgetrennt und einen Tag mit Toluolwasser geschüttelt, ließ er nur 5,75 S.E. in Lösung gehen. Diese Auf-

lösung verbesserten wir in der Folge durch Anwendung von sehr verdünntem Ammoniak (vgl. Nr. 4 und 7 der Tab. 10). Die durch gehärtetes Papier filtrierte Invertinlösung war bräunlich und besaß noch den Geruch des Autolysates; aus ihr adsorbierten wir das Enzym bei einem Essigsäuregehalt = n/3 mit 28 g Kaolin und saugten sehr rasch die Restlösung vom Adsorbat ab. Nun lieferte die Elution mit 0,06proz. Ammoniak 4,73 S.E. (83% der [213] adsorbierten Menge), die bei gelindem Ansäuern mit Essigsäure, worauf allmählich etwas braun gefärbtes Kaolin ausflockte, und beim Eindampfen des Filtrates auf 4,19 S.E. zurückgingen. Den größeren Teil des Präparates unterwarf man zur Bestimmung des Reinheitsgrades unter Anwendung von sog. Fischblasen der Dialyse (3,29 S.E., ohne Verlust) und der Elektrodialyse ($1^1/_2$ Stunden bis zu einer Stromstärke von 0,1 Milliamp., Verlust 9%) und fand aus der Saccharasewirkung nach allen Operationen S.W. 3,06 (d. i. Zeitwert 0,327).

C. Nach Fällung mit Alkohol Adsorption aus verdünnter und möglichst saurer Lösung.

Der durch eine einzige Adsorptionsvornahme zu erzielende Reinheitsgrad läßt sich noch weiter steigern, wenn man nach der Erkenntnis der IV. Abhandlung die Adsorption in großer Verdünnung und zugleich gemäß dem hier mitgeteilten Fortschritt in der höchsten bei sehr raschem Arbeiten erträglichen Acidität vornimmt. Verdünnung bei sehr hohem Säuregehalt begünstigt mehr die Adsorption des Invertins als die der Begleitstoffe. Der Adsorptionswert des Kaolins steigt, wenn 1 S.E. von 300 ccm auf 1000 und 2000 ccm verdünnt wird, von 0,3 auf 0,4 und 0,5 und übertrifft also das bisher Erreichte. Die Adsorption ist unter diesen Bedingungen noch [214] günstiger auswählend; denn die Beimischungen von Kohlehydraten werden vollkommen abgetrennt, während die Präparate Nr. 1 und 3 der voranstehenden Tabelle noch kleine Mengen Hefegummi enthalten haben.

Von einem 25 Monate alten Neutralautolysat wurden 4 l (22,6 E.) mit dem gleichen Volumen 95proz. Alkohols gefällt. Der Niederschlag gab an Wasser bei kurzem Schütteln 18,7 E. ab. Nun erfolgte aus 37 l n/3-essigsaurer Lösung die Adsorption durch 36 g Zettlitzer Kaolin und zwar mit so rascher Abtrennung des Adsorbates, daß das Enzym höchstens 20 Minuten der Säure preisgegeben war. Adsorbiert wurden 18,2 E., entsprechend dem A.W. 0,505 des Kaolins, eluiert durch 0,4proz. Dinatriumphosphatlösung 11,9 S.E., d. i. 65,5%. Ein Zehntel der Elution lieferte bei viertägiger Dialyse aus sog. Fischblasen und bei der Elektrodialyse bis zur Stromstärke 0,1 Milliamp. ohne Verlust 1,19 S.E. mit dem Trockengewicht von 16,94 mg. Der S.W. betrug mithin 3,52 (Zeitwert 0,284), die Ausbeute 53% vom Autolysat.

D. Aufeinanderfolgende Adsorption mit Kaolin und Tonerde.

Für zwei aufeinanderfolgende Adsorptionsvornahmen ist die geeignete Reihenfolge: zuerst Kaolin-, dann Tonerde-Adsorption. Wiederholte Anwendung von Kaolin oder Adsorption mit Kaolin nach vorangehender Steigerung des Reinheitsgrades

z. B. mit Hilfe von Tonerde ist unvorteilhaft, was in der mit dem Reinheitsgrad zunehmenden Zersetzlichkeit der Saccharase an der Kaolinoberfläche seine Erklärung findet (siehe Abschn. I).

Mit vorangehender Alkoholfällung nach dem in C beschriebenen Verfahren führte die Kombination einmaliger Kaolin- und Tonerde-Adsorption z. B. zum Saccharasewert 5,6, ohne Vorreinigung durch Alkohol ergaben mehrere Beispiele Saccharasewerte von ungefähr 4.

Beispiel mit Alkoholvorreinigung.

Von der Elution aus dem in verdünnter, $^n/_3$-essigsaurer Lösung gewonnenen Kaolinadsorbat wurden 4,5 S.E. nach der Dialyse auf 4,5 l und einen Gehalt von $^n/_{20}$-Essigsäure [215] gebracht. Zur Adsorption diente Tonerde *B* (0,208 g Al_2O_3), die 3,68 E. aufnahm; daraus ergab sich für den Adsorptionsgrad 82 der A.W. 17,7[1]. Vor der Isolierung des Adsorbates auf gehärteten Filtern wurde seine Suspension mit Ammoniak zu p_H 5,5 neutralisiert. Aus der Tonerde vermochten wir mit 0,4 proz. Dinatriumphosphat eine Ausbeute von 2,54 E. zu gewinnen, die in der dreitägigen Dialyse und fünfviertelstündigen Elektrodialyse nur um 0,05 E. abnahmen und noch 29% vom Hefeautolysat ausmachten. Aus dem Trockengewicht von 22,15 mg ergab sich der Saccharasewert 5,62 (Zeitwert 0,178).

Beispiel ohne Vorreinigung des Autolysates.

Durch Vermehrung der Acidität gealterter, verdünnter Autolysate wird sich die Behandlung mit Kaolin noch wirksamer gestalten lassen. Das folgende Beispiel ist noch ohne eine solche Abänderung ausgeführt, einfach durch die Kombination der beiden Adsorptionsvornahmen, die einzeln von WILLSTÄTTER und WASSERMANN beschrieben wurden.

1 l gealtertes Autolysat (3,27 S.E.) wurde mit 40 l $^n/_{20}$-Essigsäure verdünnt und mit 35 g el. osm. Kaolin adsorbiert. Die Elution mit 0,1 proz. Ammoniak ergab 3,15 S.E. Nach schwachem Ansäuern des Filtrates (900 ccm $^n/_{10}$-Essigsäure) schieden sich beim Stehen Flocken von Silicat mit Farbstoff und etwas Eiweißsubstanz aus. Mit dem auf 12 l verdünnten Filtrat führten wir unter lebhaftem Rühren die Adsorption durch Tonerde *B* (0,147 g Al_2O_3) aus und fanden im Adsorbat 2,82 E., entsprechend dem schon recht günstigen Adsorptionswert 19 der Tonerde. Die Zerlegung des Adsorbates durch $^1/_2$ l 0,1 proz. Ammoniak, weniger günstig hinsichtlich der Ausbeute als mit Phosphat, lieferte 1,7 E. Beim Ansäuern mit 12 ccm 3n-Essigsäure fiel langsam etwas peptisiertes Aluminiumhydroxyd aus und befreite die Lösung von einem Teil des Pigments, während der Rest bei der Dialyse [216] ausflockte. Die im Vakuum auf 50 ccm eingeengte, dann aus einer sog. Fischblase dialysierte Flüssigkeit war nach dem Filtrieren farb- und geruchlos, die Dialyse war aber mit einem Verlust

[1] Da das Tonerdepräparat über $^1/_2$ Jahr alt war, lieferte es auch nach längerem Umschütteln mit Glasperlen nicht den günstigsten Adsorptionswert; immerhin ist der gefundene ziemlich hoch.

von 27% verknüpft. Die Ausbeute betrug am Ende 1,24 S.E. mit einem Trockengewicht von 14,25 mg. S.W. = 4,35 (Zeitwert 0,23), Ausbeute 37,9% des Autolysates.

III. Fraktionierungsversuche, Stickstoffgehalte und Eiweißreaktionen.

Invertinpräparate unterwarfen wir der Fraktionierung mittels der Adsorptionsmethode, noch nicht eben systematisch, sondern eher suchend, und zwar so, daß mit unzureichenden Mengen vom Adsorbens ein Teil des Enzyms in der Restlösung zurückgelassen, andererseits so, daß aus dem Adsorbat mit dem Eluens bei unzureichender Zeitdauer das Enzym nur teilweise freigelegt wurde. Einige derartige Versuche werden auszugsweise und in abgekürzter Form in den Tab. 11 bis 14 dargestellt. Die Versuche von Tab. 11 (siehe S. 714) und 12 sind mit gealtertem, Versuch von Tab. 13 mit frischem Autolysat nach dem Verfahren der Adsorption durch Kaolin und Tonerde ausgeführt, der Versuch der Tab. 14, bei dessen Ausführung uns Frau Dr. JOH. WALDSCHMIDT-GRASER in dankenswerter Weise unterstützte, kombinierte das Bleifällungsverfahren mit der Tonerdeadsorption.

Das Ziel der Fraktionierung war nicht in erster Linie wie bei früheren präparativen Versuchen die Steigerung der enzymatischen Konzentration. Es hat sich nur nebenher ergeben, daß einige Fraktionen nach wiederholter Aufnahme durch Tonerde und Abgabe aus dem Adsorbat an alkalische Phosphatlösung zu höheren Zeitwerten gelangten, als man bisher erreichte, z. B.:

Präparat m_2: Zeitwert 0,163; S.W. 6,14; If. 374.
Präparat g_8: Zeitwert 0,187; S.W. 5,35; If. 325.

Alle Angaben über Saccharasewerte in dieser Arbeit sind ermittelt aus den fertigen Invertinlösungen (nach Eindampfen, Dialyse, Elektrodialyse und der letzten Filtration) und den letzten Trockengewichten. In der III. Abhandlung waren in mehreren Fällen (wenn keine [220] Ausflockung eintrat, keine Filtration nötig war), um von den Ergebnissen der Reinigung und Fraktionierung ein zutreffendes Bild zu gewinnen[1], die Zeitwerte aus der enzymatischen Wirkung **vor** dem Einengen, Dialysieren und Abdampfen und aus den nach der Dialyse bestimmten Trockengewichten abgeleitet worden. Hingegen finden es H. v. EULER und K. JOSEPHSON[2] richtiger, als Maß für den Gehalt eines Präparates an Enzym den Wert einzusetzen, der aus der Inversionsfähigkeit nach der Dialyse (wenn auch vor dem Eindampfen) erhalten wird. Enzymverluste bei der Dialyse rühren nämlich nach den Erfahrungen von H. v. EULER und K. JOSEPHSON nicht immer von einer teilweisen Inaktivierung der Saccharase her, sie können auch auf einer gewissen Durchlässigkeit der Hülse für Saccharase beruhen oder auf der Adsorption des Enzyms an der Dialysiermembran[3]. Die strengere Berechnungsweise, die wir (wie in unserer Abhandlung I, II und IV) annehmen, hat freilich den großen Nachteil, daß sie die Ergebnisse der Reinigungs- und Fraktionierungsvornahmen verschleiert. Das Dichtsein der Dialysatoren wird in jedem Falle vor und nach der Dialyse mit Lackmuslösung geprüft. In vielen Fällen verläuft die Dialyse aus sog. Fischblasen ohne Verlust, in anderen (Präp. n_5 und n_3 der Tab. 14, Präp. m_1 der Tab. 12 und Präp. k_3 der Tab. 13) mit großem Verlust. Es kam auch vor, daß bei der Dialyse in den ersten Tagen die Saccharase abnahm und bei der Fortsetzung im nämlichen Dialysator tagelang konstant blieb. Es wird doch am richtigsten sein, künftig bei steigender Reinheit der Präparate die Angaben sowohl auf das Invertierungsvermögen nach der Dialyse wie auch, wenn keine Filtration vorkommt, auf das vor den letzten Operationen zu beziehen.

---

[1] a. a. O. S. 37.
[2] Chem. Ber. Bd. 56, S. 1097 [1923], und zwar S. 1098.
[3] Vgl. Abh. I, S. 89f. und Abh. III, S. 31.

[nicht pag. Tafel].

Tabelle 11. Fraktionierungsversuch mit Invertin aus gealtertem Autolysat.

22,5 l Autolysat, 8 Mon. alt, 100,5 S.E.
↓
Alkoholfallung, Elution durch Wasser, 75,8 S.E.
↓
Adsorbiert aus $^3/_4$ n-essigsaurer Lösung mit Kaolin (A.W. 0,26), 71,2 S.E.
↓
Elution d. Ammoniak, 50,7 S.E.
↓
Adsorbiert aus neutr. Lösung mit Tonerde *C* (A.W. 11,5), 45,4 S.E.
↓
Elution d. Phosphat, 39,9 S.E.; Präp. *d*; S.W. 2,28: 8,46 % N.
↓
Fraktionierte Adsorption aus neutr. Lösung mit Tonerde *B* (A.W. 19,5), 30,85 S.E. und Restlösung, 7,15 S.E.

Zweig I:
I. Elutiou d. Phosph. 21,0 S.E.
↓
Eing. dial. 18,6 S.E.; Pr. *g*; S.W. 2,95; 10,24% N.
↓
Von ang. 12,7 S.E. ads. mit Tonerde *B* (A.W. 24) 11,24 S.E. und Restlösung 1,46 S.E.

- I. El. 3,30 E. → Eing. dial. 3,28 E. → Pr. g_1; S.W. 4,55; 9,41% N.
- II. El. 2,66 E. → Eing. dial. 2,26 E. → Pr. g_2; S.W. 3,57.
- III. El. 2,05 E. → Eing. dial. 1,81 E. → Pr. g_3; S.W. 3,57.
- Restlösung 1,46 S.E. → Ads. d. Tonerde (A.W. 24) 0,13 E. u. Restlös. 0,74 E.
  - Ads. d. Tonerde → Rasche Elution 0,39 E. → Eing. dial. 0,35 E.
  - Restlös. 0,74 E. → Eing. dial. 0,655 E. → Pr. g_4; S.W. 2,5; 7,79% N.

(g_1, g_2, g_3 zusammen:) Von 6,43 S.E. wegads. m. Tonerde *B* (A.W. 29) 1,18 E. Restlös. 5,25 E. Pr. g_5; S.W. 4,0; 9,18% N.
↓
Eing. dial. 5,25 E.; Pr. g_7; S.W. 3,7; 7,38% N.
↓
Von 4,0 S.E. in $^n/_{40}$-Essigsäure ads. d. Tonerde (A.W. 30) 1,49 S.E., ferner 1,58 S.E. und Restlös. 0,93 S.E.

- Elution d. Phosph. 2,07 E. → Eing. dial. 2,02 S.E. → Pr. g_8; S.W. 5,35; 11,32% N.
- Restlös. 0,93 S.E. → Eing. dial. 0,835 S.E. → Pr. g_9; S.W. 4,0; 6,6% N.

Zweig II:
II. Elution d. Phosph. 5,42 S.E.
↓
Eing. dial. 4,63 E.; Pr. *h*; S.W. 2,00; 12,7% N.
↓
Von 3,86 E. ads. m. Tonerde (A.W. 14) 2,76 E. u. Restlös. 1,12 E.

- Ads.: Rasche Elut. 1,83 E. → Eing. dial. 1,64 E. → Pr. h_2; S.W. 1,93; 8,47% N.
- Restlös.: Eing. dial. 1,08 E. → Pr. h_1; S.W. 1,86; 7,89% N.

Restlösung:
Restlösung, 7,15 S.E.
↓
Eing. dial. 6,32 E.; Pr. *f*; S.W. 2,44; 7,87% N.
↓
Adsorbat m. Tonerde (A.W. 20), 5,10 S.E.

- I. El. 2,16 E. → Eing. dial. 2,13 E. → Pr. f_1; S.W. 3,13; 7,16% N.
- II. El. 1,22 E. → Eing. dial. 1,01 E. → Pr. f_2; S.W. 1,73; 7,51% N.

[217] Tabelle 12. Zweites Fraktionierungsbeispiel mit gealtertem Autolysat.

1,12 l Autolysat, 26 Monate alt; 4,9 S.E. 1,24 l Autolysat, 28 Monate alt; 6,02 S.E.

↓ ↓

Alkoholfällung, Elution durch Wasser, 3,77 S.E. Alkoholfällung, Elution durch Wasser, 4,65 S.E.

↓

Adsorbiert aus $^{n}/_{3}$-essigsaurer Lösung mit Kaolin (A.W. 0,27), 8,00 S.E.

↓

Elution durch Ammoniak, 5,46 S.E.; Präp. *m*; S.W. 2,7; 5,41 % N.

↓

Von 4,75 S.E. in $^{n}/_{20}$-Essigs. ads. m. Tonerde *B* 2,03 S.E.; ferner ads. 0,92 S.E.; bei Neutr. ausgefl. aus Restlös. 1,8 S.E.

↓ ↓ ↓

Rasche El. d. Phosph. 0,67 S.E.; El. d. Phosph. 0,51 S.E.; Rasche El. d. Phosph. 0,46 S.E.

↓ ↓

Eing. dial. mit 80 % Verl. 0,135 S.E. Eing. dial. 0,415 S.E.

Präp. m_1; S.W. 1,08; 5,65 % N. Präp. m_2; S.W. 6,14; 9,53 % N.

[218] Tabelle 13. Fraktionierungsversuch mit Invertin aus frischem Autolysat.

2,3 l Autolysat (8 Tage nach Beginn der Autolyse) 28,6 S.E.

↓

Alkoholfällung, Elution durch Wasser 26,8 S.E.

↓

Adsorbiert aus 1,5 n-essigsaurer Lösung mit Kaolin (konz. Salzsäure beh.) (A.W. 0,067) 25,6 S.E.

↓

Elution durch Ammoniak 19,5 S.E.; Präparat *i*; S.W. 1,18.

↓

Adsorbiert aus neutr. Lösung mit Tonerde *C* (A.W. 9,3) 16,8 S.E.

↓

Elution durch Phosph. 15,6 S.E.; Präp. *k*; S.W. 1,93; 7,90 % N.

↓

Nach Phosphatfällung 14,2 S.E.

↓

Von 8,13 S.E. adsorbiert durch Tonerde *B* (A.W. 12,5) 8,07 S.E.

↓ ↓

Erste Elution durch Phosphat 4,80 S.E. Zweite Elution durch Phosphat 1,86 S.E.

↓ ↓

Eing. dial. 4,75 S.E.; Präparat k_1; S.W. 2,7; 8,77 % N. Eing. dial. 1,73 S.E.

↓

Von 4,33 S.E. adsorbiert durch Tonerde *B* (A.W. 17) 4,22 S.E. Präparat k_2; S.W. 1,56; 7,01 % N.

↓ ↓

Erste Elution 1,65 S.E. Zweite Elution 1,31 S.E.

↓ ↓

Eing. dial. 0,96 S.E. Eing. dial. 1,10 S.E.

Präp. k_3; S.W. 3,7; 9,70 % N. Präp. k_4; S.W. 2,78; 7,66 % N.

[219] Tabelle 14.

Fraktionierung durch Kombination der Bleifällung und Tonerdeadsorption.

9 l Autolysat, 8 Monate alt, 40,5 S.E.

↓

Vollständige Bleifällung

↓

Elution durch ammon. Phosphat 25,2 S.E.

↓

Nach Ausfällen d. Phosph. 23,3 S.E.

↓ ↓

Bleiacetatfällung 72 %. — Restlösung 28 %; 6,65 S.E.; Präp. n_1; S.W. 0,43; 11,06 % N.

↓

Elution d. ammon. Phosph. 7,00 S.E.; nach Phosphatfällung 4,9 S.E.

↓ ↓

Vollständige Bleiacetatfällung. — Von 5,62 S.E. ads. mit Tonerde *B* (A.W. 7) 4,98 S.E.

↓ ↓ ↓

El. d. ammon. Phosph. 2,8 S.E.; Präp. n_4; S.W. 1,45; 10,80 % N. — I. El. d. Phosph. 2,79 S.E. — II. El. d. Phosph. 0,65 S.E.

↓ ↓ ↓

Nach Phosph.-Fällg. von 2,41 S.E. ads. m. Tonerde *B* (A.W. 9,3) 1,87 S.E. — Eing. dial. 2,25 S.E.; Pr. n_2; S.W. 1,03; 12,57 % N. — Eing. dial. 0,455 S.E.; Pr. n_3; S.W. 1,93; 11,10 % N.

↓

Elution durch Phosphat 1,21 S.E.

↓

Eing. dial. mit 49 % Verl. 0,62 S.E.
Präp. n_5; S.W. 1,70; 11,39 % N.

[220] In erster Linie bezweckt die Fraktionierung, den Zusammenhang zwischen dem Reinheitsgrad der Saccharase und ihrem Stickstoffgehalt sowie ihren qualitativen Eiweißreaktionen zu prüfen.

Aus unseren früheren Analysen war kein Zusammenhang zwischen Saccharasewirkung und Stickstoffgehalt zu erkennen. Die in Abhandlung III analysierten Präparate *l* und *m* enthielten bei Zeitwerten von 0,20 und 0,29 an Stickstoff 12,71 und 17,49 %, während in der II. Abhandlung Präparate vom Zeitwert 1,0 und 1,4 mit 5,2 bzw. 4,0 % Stickstoff angeführt waren. Viele der früher untersuchten Präparate gaben stark oder wenigstens deutlich die üblichen Eiweißreaktionen, und
[221] zwar erschien besonders kennzeichnend und hartnäckig die Probe mit Millonreagens, die Abscheidung violettroter oder rotbrauner Flocken, ähnlich wie bei Albumin. Nur in besonderen Fällen, bei weitgehender Reinigung, waren die Millonprobe und andere Proteinreaktionen mit 0,25- bis 0,5proz. Lösung der Präparate negativ ausgefallen (Abhandlung I, Nr. 173 und 174; Abhandlung II, Nr. 8 und 12; Abhandlung III, Nr. *l* und *m*). Darauf gründet sich die Angabe[1], die Saccharase sei frei von Proteinen (wie von Kohlehydraten) erhalten worden.

[1] Abhandlung III, S. 48 und R. WILLSTÄTTER, Chem. Ber. Bd. 55, S. 3601 [1922], und zwar S. 3622.

Die sorgfältigen letzten Untersuchungen von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[2] geben Veranlassung, diese wichtigen Fragen, wie es auch schon beabsichtigt war, eindringender zu prüfen. Die Analyse einer Anzahl von Stockholmer Saccharasepräparaten mit If größer als 100 (Zeitwert kleiner als 0,61) haben Quotienten $\frac{\text{If}}{\text{Proz. Stickstoff}}$ von 20,9 bis 23,8, demnach „eine beinahe vollständige Proportionalität zwischen If und Prozente Stickstoff" ergeben („Proportionalitätsregel"). Daraus wird von H. v. EULER und K. JOSEPHSON geschlossen: „Von einem gewissen Reinheitsgrad (If etwa 100) an scheint somit der Stickstoffgehalt unserer Saccharasepräparate ziemlich konstant zu sein, indem eine gewisse Aktivität einem gewissen Stickstoffgehalt entspricht," und ferner „wir finden einen Stickstoffgehalt, welcher mit dem Reinheitsgrad steigt und welcher der Größenordnung nach mit dem für Eiweißstoffe im Mittel gefundenen ... übereinstimmt."

Unsere aus den Fraktionierungen hervorgegangenen Präparate lassen nach den in der Tab. 15 angeführten Analysen keine solche Beziehung zwischen enzymatischer Konzentration und Stickstoffgehalt ersehen. Es befinden sich Invertinpräparate darunter, die bei einem Zeitwert von 0,52 und 0,50 12,57 und 12,68% Stickstoff enthalten, gegenüber anderen, die bei einem Zeitwert von 0,25 6,61 und 9,18% **[222]** Stickstoff aufweisen. Von zwei einander nahestehenden Präparaten hat das eine, g_8,

Tabelle 15. Stickstoffbestimmungen einiger Invertinpräparate.
I. Mikro-Dumas-Bestimmungen nach PREGL.

Nr.	Präparat	S.W.	Subst. mg	Stickstoffvol. ccm (korr.)	Temp. $t°$ C	Druck mm	Proz. Stickstoff
1	d,	2,28	4,490	0,347	24	724	8,46
2	f_1,	3,13	3,082	0,202	24	722	7,16
3	f_2,	1,73	2,516	0,173	25	725	7,51
4	h_1,	1,86	2,168	0,156	24	725	7,89
5	h_2,	1,93	2,571	0,200	24	720	8,47
6	g,	2,95	1,903	0,177	21	720	10,24
7	g_1,	4,55	2,883	0,249	25	723	9,41
8	g_4,	2,50	3,492	0,249	25	725	7,79
9	g_5,	4,00	2,605	0,219	25	725	9,18
10	g_7,	3,70	2,518	0,171	25	721	7,38
11	g_8,	5,35	4,748	0,492	25	725	11,32
12	g_9,	4,00	3,291	0,200	26	725	6,61
13	k,	1,93	3,986	0,287	23	723	7,90
14	k_1,	2,70	2,088	0,167	25	719	8,77
15	k_2,	1,56	5,253	0,339	25	721	7,01
16	k_3,	3,70	2,839	0,253	25	722	9,70
17	k_4,	2,78	3,339	0,236	26	722	7,66
18	m,	2,70	2,309	0,115	25	721	5,41
19	m_1,	1,08	2,235	0,115	23	725	5,65
20	m_2,	6,14	1,470	0,128	24	724	9,53
21	n_1,	0,43	4,493	0,455	24	722	11,06
22	n_2,	1,93	4,838	0,559	25	722	12,57
23	n_3,	1,93	2,364	0,239	24	726	11,10
24	n_4,	1,45	2,219	0,218	23	725	10,80
25	n_5,	1,70	3,790	0,398	26	722	11,39

[2] Chem. Ber. Bd. 56, S. 1097 [1923].

II. Mikro-Kjeldahl-Bestimmungen nach PREGL.

Nr.	Präparat S.W.	Subst. mg	Erh. Ammoniak entspr. n/10-Salzsäure ccm	Gef. Stickstoff mg	Proz. Stickstoff	Gef. Asche mg	Proz. Asche
1	g, 2,95	5,138	2,670	0,534	10,39		
	g, 2,95	4,086	2,090	0,418	10,25	0,016	0,39
	g, 2,95	4,086	2,120	0,424	10,37		
2	f, 2,44	4,836	1,905	0,381	7,87	0,022	0,45
	f, 2,44	4,836	1,890	0,378	7,84		
3	h, 2,00	2,066	1,335	0,267	12,89	0,005	0,25
	h, 2,00	2,066	1,310	0,263	12,68		
5	k, 1,93	6,158	2,485	0,497	8,07	0,020	0,33
	k, 1,93	6,158	2,475	0,495	8,03		

bei S.W. 5,35 den Stickstoffgehalt 11,3%, das andere, g_9, aus der zugehörigen Restlösung bei S.W. 4,0, den Stickstoffgehalt 6,61%. Überhaupt bleiben bei unvollständiger Adsorption gewöhnlich stickstoffärmere Anteile des Enzyms in der Restlösung. Besonders stickstoffreich (wie früher) sind die durch Bleifällung dargestellten Präparate. Die in der Tab. 16 (unter Ausschluß von Fällen mit großem Dialysenverlust) angeführten Quotienten $\frac{\text{If}}{\text{Proz. Stickstoff}}$, die auch in unseren Proben [223] vor der Fraktionierung (d, f, g mit If 139, 149, 180) mit den Werten 16,4, 18,9 und 17,5 annähernd konstant waren, bewegen sich daher bei den fraktionierten Präparaten mit If 117 bis 374 zwischen 9,3 und 39,2. Die Ausschläge wären noch bedeutender, wenn nicht die Saccharasewerte nach den bei der Dialyse eingetretenen Wirkungseinbußen eingesetzt worden wären.

Tabelle 16. Stickstoffgehalte und Inversionsfähigkeit einiger Invertinpräparate.

Präparat	n_4	k_2	n_2	n_3	h_2	k	h_1	f_2	h	d	f
Saccharasewert	1,45	1,56	1,93	1,93	1,93	1,93	1,86	1,73	2,00	2,28	2,44
Proz. Stickstoff	10,80	7,01	12,57	11,10	8,47	7,90	7,89	7,51	12,68	8,46	7,87
$\frac{\text{If}}{\text{Proz. Stickstoff}}$	8,1	13,5	9,3	10,6	13,9	14,9	14,4	14,0	9,6	16,4	18,9

Präparat	g	k_1	g_4	k_4	m	g_1	g_5	g_9	g_8	m_2	g_9
Saccharasewert	2,95	2,70	2,50	2,78	2,70	4,55	4,00	4,00	5,35	6,14	4,00
Proz. Stickstoff	10,24	8,77	7,79	7,66	5,41	9,41	9,18	6,61	11,32	9,53	6,61
$\frac{\text{If}}{\text{Proz. Stickstoff}}$	17,5	18,7	19,5	22,1	30,3	29,4	26,5	36,8	28,7	39,2	36,8

[224] Diese analytischen Ergebnisse zeigen, daß das Enzym auch noch in den Präparaten von S.W. 5 (If 304) mit wechselnden Mengen von Begleitstoffen wechselnder Natur vergesellschaftet ist.

Die analysierten Präparate haben Aschengehalte von nur 0,25 bis 0,50%, wovon Beispiele bei den Kjeldahlbestimmungen angeführt sind. Die Stickstoffzahlen sind nicht auf aschefreie Substanz umgerechnet.

Nach den Untersuchungen von H. v. EULER und K. JOSEPHSON sprechen auch die qualitativen Reaktionen dafür, daß die „reinsten Saccharasepräparate ihrer

chemischen Natur nach in hohem Grade an native Eiweißstoffe erinnern"; in hinreichend konzentrierten Lösungen gaben die Präparate die typischen Eiweißreaktionen.

Die Prüfung unserer Enzymfraktionen mit typischen Eiweißreagenzien ist mit größeren Substanzmengen und Konzentrationen als früher vorgenommen worden. Das Ergebnis ist, daß die Präparate außerordentlich differieren. Einige der besten und beständigsten Präparate (If > 245, S.W. 4 bis 5) gaben die Millonprobe stark und so charakteristisch wie Hühnereiweiß. Bei einem anderen Präparat (k_2 vom S.W. 1,56) blieb die Reaktion gänzlich und wieder bei anderen beinahe ganz aus.

Da die aus sehr lange gealterten Autolysaten gewonnenen Enzympräparate am kräftigsten die Millonprobe aufwiesen, die aus frischem Autolysat aber am schwächsten, so scheint es leichter zu sein, native, als abgebaute Proteine vom Enzym weitgehend zu trennen. Bei Präparaten aus frischem Autolysat fiel die Millonreaktion wie auch nach der Beschreibung von EULER und JOSEPHSON[1] anders aus als sonst; bei einer Konzentration der Präparate von 0,25 bis 0,50% färbte sich die Flüssigkeit bräunlich oder hellbräunlich und es bildete sich nur ein geringer Niederschlag von feinen Flöckchen.

Um der qualitativen Prüfung den Wert einer Mengenschätzung zu geben, stellten wir eine Skala von Millonproben mit gewogenen Mengen von Hühnereiweiß auf von

[225] Tabelle 17. Millonprobe und andere Reaktionen der Invertinpräparate.

Nr.	Präparat S.W.	Stärke der Millonprobe	Menge Präparat in 0,5 ccm mg	Saccharasegeh. in 0,5 ccm S.E.	Für die Millonreakt. äqu. Albumin in 0,5 ccm mg	Millonäquivalent für 1 S.E.	Millonäquivalent für 100 mg	Ninhydrin	Biuret	Fehling-red. nach Erhitzen mit Salzsäure
1	f_1, 3,13	sehr schwach	1,5	0,094	0,01	0,11	0,67	—	schwach	stark
2	f_2, 1,73	,, ,,	1,5	0,052	0,01	0,20	0,67	schwach	,,	,,
3	h_1, 1,86	schwach	1,5	0,055	0,10	1,8	6,7	,,	,,	,,
4	h_2, 1,93	mittelstark	1,5	0,060	0,35	5,8	23	,,	,,	sehr schwach
5	g_4, 2,50	sehr schwach	1,5	0,075	0,01	0,13	0,67	,,	,,	schwach
6	g_5, 4,00	mittelstark	0,5	0,027	0,10	2,5	20	—	—	—
7	g_7, 3,70	,,	2,5	0,185	0,75	4,3	30	mittelstark	mittelstark	—
8	g_8, 5,35	,,	0,75	0,079	0,25	3,2	33	schwach	,,	negativ
9	g_9, 4,00	,,	0,75	0,063	0,25	4,0	33	,,	—	,,
10	k_2, 1,56	negativ	2,5	0,078	—	0	0	negativ	negativ	sehr schwach
11	k_3, 3,70	schwach	1,25	0,093	0,10	1,1	8	sehr schwach	sehr schwach	negativ
12	k_4, 2,78	sehr schwach	1,5	0,083	0,10	1,2	6,7	,, ,,	,, ,,	sehr schwach
13	m, 2,70	schwach	0,5	0,027	0,05	1,8	10	—	—	—
14	m_1, 1,08	mittelstark	0,5	0,011	0,10	9,1	20	—	—	—
15	m_2, 6,14	,,	0,35	0,023	0,10	4,3	28	—	—	—
16	n_1, 0,43	sehr stark	2,5	0,022	1,25	57	50	sehr stark	sehr stark	negativ
17	n_2, 1,93	,, ,,	2,5	0,095	1,50	16	60	,, ,,	,, ,,	,,
18	n_3, 1,93	,, ,,	0,75	0,035	0,50	14	100	,, ,,	,, ,,	,,
19	n_4, 1,45	,, ,,	1,25	0,036	0,75	21	60	,, ,,	,, ,,	,,
20	n_5, 1,70	,, ,,	1,25	0,042	0,75	18	60	,, ,,	,, ,,	,,

[1] a. a. O. S. 1099.

[226] 0,01 bis 2,5 mg Albumin in 0,5 ccm. Die Millonprobe der Invertinpräparate führten wir in 0,07- bis 0,5proz. Lösung mit Mengen von 0,35 bis 2,5 mg aus und verglichen, welche Albuminmenge der gefundenen Reaktion entsprach. Die Ergebnisse werden zusammen mit anderen qualitativen Reaktionen in der Tab. 17 mit zwei einander ergänzenden Berechnungsweisen angeführt. Es werden sowohl die Mengen Albumin, „Millonäquivalent für 100 mg", verzeichnet, die eine ebenso starke Millonreaktion liefern wie 100 mg Saccharasepräparat, wie andererseits die Mengen Albumin, „Millonäquivalent für eine Saccharaseeinheit", die in der Millonreaktion mit der eine Einheit enthaltenden Invertinmenge übereinstimmen.

Bei einigen der geprüften Invertinpräparate entsprach die Millonreaktion einer Saccharaseeinheit derjenigen von 0,11 und 0,20 mg, bei anderen der von 57 und 21 mg Albumin, während die mit 100 mg derselben Präparate übereinstimmende Millonreaktion von 0,67 mg Albumin im einen Falle, von 100 mg im anderen Falle hervorgerufen wurde. Die Eiweißreaktion fällt also bei einem der Invertinpräparate 200mal schwächer aus als bei einem anderen.

Anhang

von R. WILLSTÄTTER und R. KUHN.

Für die Umrechnung von If auf S.W. benützen H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] die Gleichung

(1) $$L_{max} = R_{max}\ (0{,}44 - 0{,}005\ t)\,,$$

die anscheinend auf Messungen J. KJELDAHLS[2] zurückgeht. Nach einer neueren, sorgfältigen Untersuchung von C. S. HUDSON[3] gilt indessen für die enzymatische Inversion:

(2) $$L_{max} = R_{max}\ (0{,}417 - 0{,}005\ t)\,,$$

[227] wobei L_{max} die (maximale) Linksdrehung einer vollständig invertierten Rohrzuckerlösung vom anfänglichen Drehungsvermögen R_{max} bei der Temperatur $t°$ bedeutet. HUDSONS Beziehung, die durch unsere eigenen Versuche bestätigt wird, steht mit den von S. P. L. SÖRENSEN[1]), L. MICHAELIS und M. L. MENTEN[2]) und anderen Forschern benutzten Zahlenwerten in besserer Übereinstimmung als die KJELDAHLS. Geringe Abweichungen sind daher zu erklären, daß sich nach W. C. VOSBURGH[3]) der Temperaturkoeffizient des Drehungsvermögens der Fructose mit der Konzentration der Lösungen etwas ändert. Legt man nun der Berechnung von $k = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a - x}$ und von If $= \frac{k \times g\ \text{Zucker}}{g\ \text{Präparat}}$ die von HUDSON ermittelte Gleichung zugrunde, so findet

[1] Chem. Ber. Bd. 56, S. 1749 [1923], und zwar S. 1750.
[2] Medd. frå Carlsberg Labor., 3. Heft [1881].
[3] Journ. Ind. Eng. Chem. Bd. 2, S. 143 [1910].
[1]) Biochem. Zs. Bd. 21, S. 131 [1909], und zwar S. 262.
[2]) Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1914].
[3]) Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 42, S. 1696 [1920].

man unter der Annahme eines Temperaturkoeffizienten der Inversionsgeschwindigkeiten von 10% für 1 Grad:

Polarisationstemperatur (°)	Gespaltener Rohrzucker für $d_D = \pm 0°$ (%)	Reaktionskonst. × Nulldrehungszeit	If_0 : S.W.
15,5	74,68	0,597	47,8
18	75,36	0,608	60,8
20	75,93	0,619	71,8

Bei 20° wird also $\alpha_D = \pm 0°$, wenn 75,93% des vorhandenen Zuckers gespalten sind (R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[4] gaben 75,75% an), während man nach H. v. EULERS Berechnungsweise 74,63% findet. Die in den Untersuchungen von H. v. EULER und seinen Mitarbeitern berechneten If- und If_0-Werte werden, wenn man sie nach HUDSON umrechnet, durchschnittlich um 5% größer. Die auf dem Umwege über If ermittelten Minuten- bzw. Saccharasewerte stimmen dagegen in beiden Fällen auf ±1% überein.

[228] Für das von EULER und JOSEPHSON gegebene Beispiel der If-Bestimmung[1] findet man:

	If^{18}	If_0^{18}	± 0° (Min.)	S.W.
Nach Gleichung (1)	220	238	0,246	4,06
,, ,, (2)	230	250	0,243	4,11

[4] Liebigs, Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 7.
[1] a. a. O., und zwar S. 1751 f.

Zeitschrift für physiologische Chemie **133**, S. 1 [1924].

51. ÜBER ENZYMADSORPTION. I.

Von HEINRICH KRAUT* und ERWIN WENZEL.

(VI. Abhandlung zur Kenntnis des Invertins von R. WILLSTÄTTER und Mitarbeitern.)

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 16. Oktober 1923.)

Die Fähigkeit der Enzyme, sich an Stoffe mit großer Oberfläche, wie Kohle, Tonerde, Kaolin anzulagern, wurde von L. MICHAELIS und M. EHRENREICH[1] zu einer Entscheidung über den elektropositiven oder -negativen Charakter der verschiedenen Enzyme verwendet. Später diente die Adsorption R. WILLSTÄTTER und seinen Mitarbeitern[2] zur Trennung der Enzyme von den Begleitstoffen, mit denen vermischt sie aus den Organen von Pflanze und Tier gewonnen werden, und dies ist heute das erfolgreichste Verfahren der Enzymreinigung. Dabei stellte sich heraus, daß der Grad, in dem ein Enzym von einem basischen oder sauren Adsorbens aufgenommen wird, nicht nur von seinem eigenen chemischen Verhalten, sondern auch in sehr hohem Maß von dem seiner Begleitstoffe bedingt wird. [2] Bei der Anlagerung an ein Adsorbens von bestimmtem Charakter offenbart sich uns also weniger das Adsorptionsverhalten des reinen Enzyms selbst als vielmehr des ganzen „Systems", mit dem das Enzym in seinem jeweiligen Reinheitsgrad vergesellschaftet ist.

Der Einfluß, den das System auf die Adsorption ausübt, kann sich in drei Richtungen betätigen. Es wird einmal das Enzym an Stoffe gebunden sein, die durch Besetzung der für die Adsorption verantwortlichen Stelle des Enzyms diese verhindern, oder an Stoffe, die selbst adsorbiert werden und erst dadurch das Enzym adsorbierbar machen. Unter diese beiden Gruppen werden wir in der Hauptsache die Stoffe zu rechnen haben, die in der ersten Abhandlung dieser Reihe von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[1]) als Koadsorbentien und Koeluentien bezeichnet wurden. Eine weitere

* *Die vorliegende und die nachfolgende Abhandlung sind zusammengefaßt in „Untersuchungen über die Adsorption von Enzymen und anderen hochmolekularen Stoffen", Habilitationsschrift von H. Kraut, Universität München, 1925.*

[1] Biochem. Zs. Bd. 10, S. 283 [1908].

[2] Siehe besonders den zusammenfassenden Vortrag von R. WILLSTÄTTER: Über die Isolierung von Enzymen, Chem. Ber. Bd. 55, S. 3601 [1922] (*Abh. 2*).

[1]) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 (1920/21), und zwar S. 60.

Gruppe von Begleitstoffen wird — ohne jede chemische Beziehung zum Enzym — dadurch wirksam sein, daß sie selbst von dem Adsorbens aufgenommen wird, also die dem Enzym zur Verfügung stehende Oberfläche vermindert.

Unsere Betrachtung des Einflusses, den die Begleitstoffe auf die Adsorption ausüben, erstreckt sich nach zwei Richtungen: Willkürliche Veränderungen des Systems, aus dem wir ein Enzym adsorbieren, werden uns die günstigsten Bedingungen der Adsorption auffinden lassen. Eine Kenntnis der Abweichungen, denen der quantitative Verlauf der Adsorption durch die Begleitstoffe unterliegt, wird uns eine Aussage über die Reinheit des Enzyms gestatten, d. h. wieweit es gelungen ist, das Enzym von seinen „das System" bildenden Begleitstoffen zu trennen.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Adsorption des Invertins an Aluminiumhydroxyd, und wir versuchen, eine erste Orientierung über den Einfluß derjenigen Begleitstoffe aus den Hefeautolysaten zu geben, die neben dem Invertin selbst von der Tonerde adsorbiert werden. Durch die Freundlichkeit der Herren R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER wurde uns das Enzymmaterial der vorangehenden [3] fünften Abhandlung über Invertin zugänglich gemacht. Wir verweisen daher an Stelle von Angaben über die Herkunft unserer Präparate auf die betreffenden Stellen dieser Abhandlung und sprechen zugleich Herrn Geheimrat R. WILLSTÄTTER für sein gütiges Entgegenkommen und die wohlwollende Unterstützung unserer Arbeit herzlichen Dank aus.

I. Gesetzmäßigkeiten der Adsorption von Gemischen.

Die quantitative Untersuchung des Adsorptionsverlaufs betrachtet die Beziehungen zwischen der von dem Adsorbens aufgenommenen zu der in der Lösung verbliebenen Menge des Adsorbendums, d. h. das Verhältnis der Konzentration des adsorbierten Stoffs im Adsorbat zu seiner Konzentration in der Lösung nach der Adsorption. Für sehr viele Stoffe ist als Gesetz dieser Beziehungen die Adsorptionsisotherme empirisch festgestellt worden[1]:

$$a = \alpha c^{\frac{1}{n}},$$

wo a die von der Einheit des Adsorptionsmittels aufgenommene Menge, c die Konzentration des Adsorbendums in der Restlösung, d. h. in der Lösung nach erfolgter Adsorption bedeuten, und α und n Konstanten sind.

Daß diese Adsorptionsisotherme auch für die Enzymadsorption gelte, können wir nur vermuten, aber bei der Unzugänglichkeit eines reinen Enzyms vorläufig nicht nachprüfen. Auf jeden Fall muß aber die Enzymadsorption mit der Gesetz-

[1] s. H. FREUNDLICH, Kapillarchemie, 2. Aufl. Leipzig 1922, S. 232ff. FREUNDLICH bezeichnet die Konstante α der Adsorptionsisotherme als Adsorptionswert, während wir hier, der Gewohnheit dieser Publikationsreihe folgend, mit Adsorptionswert (A.W.) die Zahl a, d. h. die von der Einheit des Adsorptionsmittels aufgenommene Enzymmenge bezeichnen. Siehe R. WILLSTÄTTER und W. WASSERMANN, Diese Zs. B. 123, S. 181 [1922], und zwar S. 184.

mäßigkeit verlaufen, daß einer größeren Konzentration in der Restlösung auch ein größerer Adsorptionswert, also eine größere Konzentration im Adsorbat entspricht.

Wir betrachten nun (Abb. 1) den Verlauf der Invertinadsorption an Aluminiumhydroxyd aus einem 12 Monate alten [4] Hefeautolysat. Die Anfangskonzentration ist durch Verdünnen mit Wasser so gewählt, daß sich vor der Adsorption eine Invertineinheit (1 S.E.) in 10 l Wasser befindet. Die Versuche führten wir in der Weise aus, daß wir zu einem bestimmten Volumen dieser Ausgangslösung wechselnde Mengen von Tonerde zufügten und dann nach Abtrennung des Adsorbats den Invertingehalt der Restlösung bestimmten. Daraus berechneten sich die Konzentrationen des Invertins in den Restlösungen (c = Anzahl S.E. in 1 l Restlösung) und in den Adsorbaten (A.W. = Anzahl S.E., welche von 1 g Al_2O_3 adsorbiert werden). In den Abbildungen sind als Ordinaten die Adsorptionswerte aufgetragen, als Abszissen die Invertinkonzentrationen der zugehörigen Restlösungen.

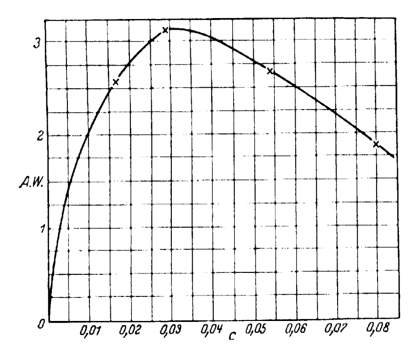


Abb. 1. Invertinadsorption aus einem Hefeautolysat an Tonerde.

Als resultierende Kurve ist bei einem reinen Stoff die Adsorptionsisotherme zu erwarten. In der Tat steigen in Abb. 1 die Adsorptionswerte[1] anfänglich, der Adsorptionsisotherme [5] entsprechend, mit steigender Konzentration des Enzyms in der Restlösung steil an, der Anstieg verlangsamt sich allmählich, um bei einem A.W. von 3 S.E. pro g Al_2O_3 sein Maximum zu erreichen. Während aber die Adsorptionsisotherme nun einen annähernd horizontalen Verlauf, also eine Sättigung des Adsorptionsmittels mit Invertin verlangt, sehen wir einen steilen Abfall der Kurve, beginnend bei einer Konzentration der Restlösung von 0,03 S.E. pro 1 l, d. h. bei einer Adsorption von einem Drittel des vorhandenen Invertins. Während zu erwarten wäre, daß vom kleinsten Zusatz von Tonerde, d. h. bei der höchsten Invertinkonzentration relativ am meisten Invertin adsorbiert wird, stellt sich dieses Maximum der Adsorptionswerte erst bei viel größeren Zusätzen von Tonerde ein[1]).

Die Erklärung für dieses Verhalten liegt in der Tatsache, daß wir das Invertin nicht als reinen Stoff, sondern aus einem Gemisch mit sehr vielen Fremdstoffen adsorbieren, die zum Teil ebenfalls adsorbiert werden. Die Gesetze der Adsorption von Gemischen sind in groben Zügen bekannt. Die verschiedenen Stoffe verdrängen sich gegenseitig an der Oberfläche des Adsorptionsmittels. Für den Raum, den der

[1] Eine Zusammenstellung der Versuchsergebnisse findet sich am Schluß der Abhandlung, dabei sind auch die verwendeten Präparate näher beschrieben.

[1]) Diese Tatsache wurde schon in der 1. Abhandlung über Invertin beobachtet. Siehe Liebigs, Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 73.

einzelne Stoff dabei für sich beansprucht, sind maßgebend seine Konzentration und seine Adsorbierbarkeit[2]. Alle Stoffe zusammen werden ungefähr in demselben (molaren) Betrag adsorbiert, wie jeder einzelne von ihnen aus seiner reinen Lösung.

Nun stehen aber Konzentration und Adsorbierbarkeit in einem engen Zusammenhang. In Abb. 2 sind beliebige Adsorptionskurven verschiedener Stoffe gezeichnet. Man sieht, daß bei manchen Kurven die „Adsorbierbarkeit", d. h. die Adsorptionswerte der reinen Lösungen mit der Konzentration der Restlösung rascher ansteigen als bei anderen und auch rascher ihr Maximum, d. h. den horizontalen Verlauf erreichen. Wir wollen annehmen, daß in unserem Fall die rasch ansteigende [6] Kurve 1 die des Invertins sei, die langsam ansteigende Kurve 2 die Durchschnittskurve des adsorbierbaren Teils der Begleitstoffe. Diese Annahme ist nicht ganz willkürlich. Es ist bekannt, daß durch Einführung derselben chemischen Gruppen oft bei einem gelösten Stoff die Adsorbierbarkeit, bei einem Adsorbens aber die Adsorptionstüchtigkeit sich erhöht[1]. Nun sind die Enzyme dadurch ausgezeichnet, daß sie schon in ganz geringen Mengen große Wirkungen ausüben, also eine große Anlagerungsfähigkeit für ihre Substrate besitzen, und wir dürfen daher annehmen, daß sie auch als Adsorbenda sich durch große Adsorbierbarkeit bei kleiner Konzentration in Lösung, d. h. durch einen steilen Anstieg ihrer Adsorptionskurven auszeichnen.

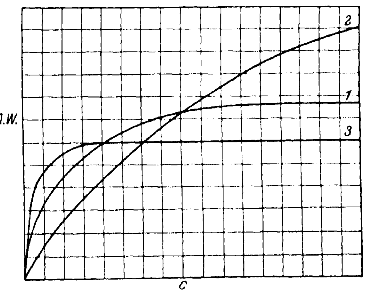


Abb. 2. Beispiele von Adsorptionskurven.

Bei gemeinsamer Adsorption werden die verschiedenen Stoffe der Lösung, entsprechend ihrer Adsorbierbarkeit, sich in die Oberfläche des Aluminiumhydroxyds teilen. Gehen wir in unserem Beispiel vom rechten Ende unserer Kurven aus, indem wir wenig Aluminiumhydroxyd zusetzen, so sind die [7] Konzentrationen aller Stoffe in der Lösung groß und die Begleitstoffe (Kurve 2) beanspruchen, ihrem hohen Adsorptionswert entsprechend, einen erheblichen Teil der Tonerde. Bei Zugabe von mehr Aluminiumhydroxyd verringern wir die Konzentrationen in der Restlösung, begeben uns also auf der Abszisse der Abb. 2 nach links. Beim Invertin (Kurve 1) ändert sich dabei die Adsorbierbarkeit, der Adsorptionswert der reinen Lösung, wenig, der Adsorptionswert der Kurve 2 sinkt aber, die Begleitstoffe verlieren an Adsorbierbarkeit. Die Folge ist, daß sie einen kleineren Raum auf der Adsorbensoberfläche einnehmen, also dem Invertin einen größeren Betrag überlassen müssen, so daß mit abnehmendem Gehalt der Restlösung die Invertinadsorptionswerte ansteigen bis zu dem Punkt, an dem der steile Abfall der reinen Invertinkurve beginnt. Von dieser Konzentration der Restlösung ab werden auch die Adsorptionswerte des Invertins im Gemisch bis zum Kurvenursprung sinken.

[2] FREUNDLICH, Kapillarchemie, S. 269. [3] FREUNDLICH, Kapillarchemie, S. 257.

Einem solchen Verhalten entspricht völlig das Bild der Adsorptionskurve des Invertins aus dem Hefeautolysat, wie es Abb. 1 darstellt. Beim Ursprung der Kurve, also bei kleinen Konzentrationen der Restlösung beginnend, steigen die Adsorptionswerte steil an, bei höheren Konzentrationen überwiegt aber der Einfluß der Begleitstoffe, nach einem scharfen Maximum fallen die Adsorptionswerte wieder ab.

Über das Adsorptionsverhalten der Begleitstoffe fehlt es uns fast gänzlich an systematischen Angaben[1]. Wir können also auch von vornherein nicht annehmen, daß die durchschnittliche Adsorptionskurve der Begleitstoffe stets in einem ähnlichen Verhältnis zu der des Enzyms steht, wie es Kurve 1 und 2 der Abb. 2 darstellen, und wie es für die Invertinadsorption aus dem Hefeautolysat verwirklicht zu sein scheint. Es wird im Gegenteil häufig vorkommen, daß auch besser adsorbierbare Stoffe vorhanden sind, vielleicht andere Enzyme oder Enzymtrümmer, und daß diese das [8] Durchschnittsverhalten der Begleitstoffe bestimmen, wie es Kurve 3 in Abb. 2 darstellt. Die Adsorption des Enzyms aus der gemischten Lösung wird hier infolge der wachsenden Oberflächenbeanspruchung der Begleitstoffe schon bei hohen Konzentrationen einen Abfall der Adsorptionswerte aufweisen, der gegen Ende, wenn bei abnehmender Konzentration auch auf Kurve 3 der steile Abfall einsetzt, allmählich flacher wird. Ein solcher Fall liegt vielleicht bei der Adsorption der Amylase in einem Glycerinextrakt aus Pankreasdrüsen vor, deren Zahlen wir freundlicherweise einer noch unveröffentlichten Untersuchung der Herren R. Willstätter und A. F. R. Hesse entnehmen durften. Die Kurve der Amylaseadsorption an Tonerde ist in Abb. 3 dargestellt.

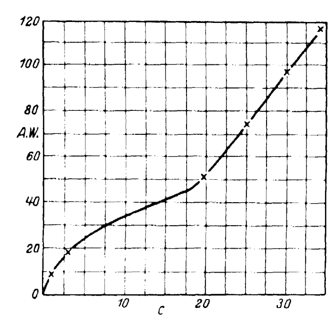


Abb. 3. Amylaseadsorption aus einem Pankreasextrakt an Tonerde.

Wir sehen hier davon ab, daß die Form unserer Kurven auch durch Begleitstoffe beeinflußt wird, die mit dem Enzym eine Adsorptionsverbindung eingehen, daß also eine Konkurrenz der Adsorbentien, statt, wie hier angenommen, der Adsorbenda vorliegen kann. Beispiele dieser anderen Art der Beeinflussung finden sich zahlreich in den vorangehenden Abhandlungen dieser Reihe. Bei Verwendung von einzelnen Adsorptionsangaben ist aber mit Vorsicht zu verfahren, da über das [9] Adsorptionsverhalten eines Enzyms in einem bestimmten Reinheitsgrad nur eine Versuchsreihe, die sich von eben beginnender bis zu fast vollständiger Adsorption erstreckt, Auskunft geben kann, nie aber eine einzige Prüfung der Adsorbierbarkeit, über deren Lage auf der Adsorptionskurve nichts bekannt ist.

[1] Eine Untersuchung hierüber haben H. v. Euler und E. Erikson begonnen, siehe diese Zs. Bd. 128, S. 1 u. 9 [1923].

II. Der Einfluß der Verdünnung auf die Adsorption von Gemischen.

In den beiden geschilderten Fällen, bei Invertin und Amylase, läßt sich schon aus dem Verlauf der Adsorptionskurve ein Rückschluß auf das Adsorptionsverhalten der Begleitstoffe und damit auf ihre Anwesenheit ziehen. Dies wird aber sehr häufig nicht möglich sein, indem sich besser und schlechter adsorbierbare Begleitstoffe in ihrer Wirkung zu einer Durchschnittskurve kompensieren, die zu der des reinen Enzyms in keinem derartig schroffen Gegensatz steht, wie Kurve 2 und 3 der Abb. 2 zu Kurve 1. Dann sind wir auf Grund des Adsorptionsverhaltens des Gemisches nicht in der Lage, uns von dem Einfluß und der ungefähren Menge der Begleitstoffe eine Vorstellung zu machen, solange wir nicht die Adsorptionskurve des reineren Enzyms kennen.

Dieser Einfluß der Begleitstoffe auf die Adsorption muß sich aber noch in einer zweiten Weise geltend machen. Die in Abb. 1 dargestellte Kurve haben wir aufgenommen, indem wir wechselnde Mengen von Tonerde zu einer Lösung, die 1 S.E. in 10 l enthielt, zusetzten. Verwendeten wir eine Lösung von 1 S.E. in 1 l, so könnte das bei einem reinen Stoff keinerlei Wirkung auf den Verlauf der Adsorptionskurve ausüben, da unabhängig von der Ausgangslösung stets derselben Endkonzentration der Restlösung derselbe Adsorptionswert, also dieselbe Konzentration im Adsorbat entsprechen muß. Anders bei einem Gemisch. Adsorbieren wir z. B. aus einem unverdünnten Hefeautolysat 80% des Invertins an Aluminiumhydroxyd, so adsorbieren wir gleichzeitig eine uns unbekannte Menge von Begleitstoffen. Durch das Zusammenwirken beider kommt für das Invertin ein bestimmter Adsorptionswert zustande, den wir in Beziehung zu der [10] Invertinkonzentration der Restlösung setzen. Verdünnen wir aber das Autolysat mit Wasser und setzen so viel Aluminiumhydroxyd zu, daß wieder dieselbe Endkonzentration des Invertins in der Restlösung erreicht wird, so würde sich derselbe Adsorptionswert für das Invertin nur dann ergeben, wenn die Raumbeanspruchung der Begleitstoffe auf der Oberfläche des Adsorbens auch aus dieser verdünnten Lösung dieselbe wäre wie aus dem unverdünnten Autolysat. Das könnte aber nur dann geschehen, wenn sich die Adsorptionskurve des reinen Invertins und die Durchschnittskurve aller vom Invertin getrennten Begleitstoffe völlig deckten (was nie der Fall sein kann). Ein zweites Beispiel ist leichter zu überblicken: Wir nehmen die Adsorptionskurve eines Invertinpräparats aus einem bestimmten Volumen auf und aus dem auf das Doppelte verdünnten Volumen. Ist das Invertin ganz rein, so erhalten wir in beiden Fällen dieselben Kurven, nur endigt die zweite Kurve natürlich bei einer halb so großen Konzentration der Restlösung. Bei unreinem Invertin aber könnte die zweite Kurve nur dann genau auf der ersten endigen, wenn hier, bei der Adsorption von 50% des Invertins, gerade 50% der Begleitstoffe adsorbiert würden. Die Folge ist, daß entgegen dem Verhalten der reinen Stoffe es für Gemische keineswegs gleichgültig ist, von welcher Anfangskonzentration ausgehend die zur Aufnahme der Adsorptionskurve nötigen Versuche angestellt werden. Jede Veränderung der Anfangskonzentration einer unreinen Lösung ergibt eine neue

Adsorptionskurve für das Enzym. Für die Prüfung der Reinheit der Enzyme ist die Umkehrung dieses Satzes von Wichtigkeit: Die Abhängigkeit der Adsorptionskurven von der Anfangskonzentration beweist das Vorhandensein von Begleitstoffen, die ebenfalls an das Adsorbens sich anlagern[1]. [11] Beim Invertin wissen wir schon aus dem Verlauf einer einzigen Adsorptionskurve, daß es von erheblichen Mengen adsorbierbarer Fremdstoffe begleitet ist. Die Richtigkeit des zweiten Kriteriums der Reinheit ließ sich daher mit seiner Hilfe experimentell nachweisen. Abb. 4 zeigt uns in 3 Kurven den Einfluß der Verdünnung auf die Adsorption von Invertin aus einem durch Voradsorption mit Kaolin etwas gereinigten, 10 Monate alten Hefeautolysat. Die Kurve 1 stellt die Adsorption aus einer Lösung dar, die 1 S.E. in 1 l enthielt, Kurve 2 und 3 die Adsorption aus der auf das Doppelte bzw. Vierfache verdünnten Lösung. Wir sehen, daß bei verschiedener Anfangskonzentration zu einer und derselben Endkonzentration der Restlösung ganz verschiedene Adsorptionswerte gehören. [12] Und zwar überwiegt in diesem Beispiel der Einfluß der Adsorptionswertsteigerung so sehr über den der Konzentrationsherabsetzung durch die Verdünnung, daß aus den verdünnten Lösungen sogar absolut höhere Invertinmengen von einer bestimmten Menge Tonerde adsorbiert werden als aus den konzentrierten. Dieses, den normalen Adsorptionsgesetzen anscheinend widersprechende Verhalten des Invertins wurde

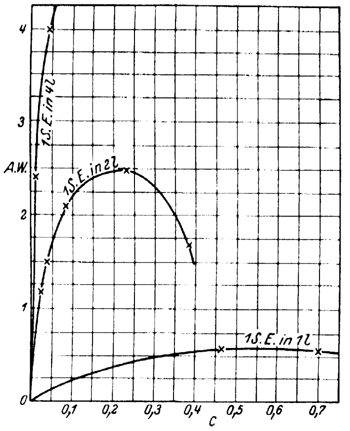


Abb. 4. Adsorptionskurven desselben Invertinpräparates bei verschiedener Anfangskonzentration.

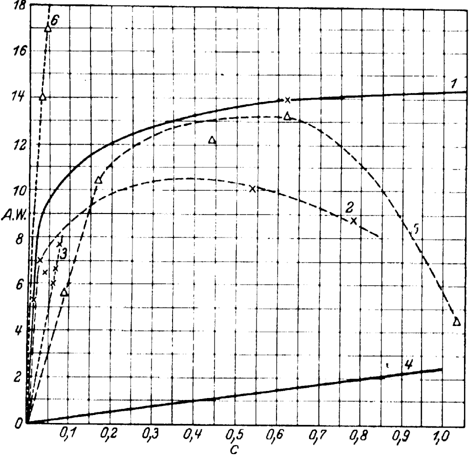


Abb. 5. Einfluß zunehmender Verdünnung auf die Adsorption an Tonerde C (Kurve 1—3) und B (Kurve 4—6). —— 1 S.E in 100 ccm. ---- in 1000 ccm. ····· in 10000 ccm.

[1] Ganz analoge Betrachtungen lassen sich anstellen, wenn man die Adsorptionskurven bei konstanter Adsorbensmenge durch Verdünnen der Enzymlösung aufnimmt, anstatt bei konstantem Volumen die Adsorbensmenge zu variieren, wie es unser Verfahren im Anschluß an die präparative Arbeitsweise ist. Entsprechend ergibt sich dann für jede Veränderung der Adsorbensmenge eine neue Kurve der Adsorption von Gemischen.

schon früher von R. WILLSTÄTTER und H. KRAUT anläßlich einer Untersuchung über die Adsorptionstüchtigkeit verschiedener Aluminiumhydroxydsorten festgestellt[1]. Die Zahlen der in [13] Abb. 4 dargestellten Kurven sind dem Beobachtungsmaterial jener Untersuchung entnommen. In der IV. Abhandlung über Invertin hat diese Feststellung eine präparative Anwendung gefunden.

Natürlich hängt es von den Beziehungen zwischen Adsorbens, Enzym und Begleitstoffen ab, ob die Herabsetzung der Anfangskonzentration durch Verdünnen eine Verbesserung oder eine Verschlechterung der Adsorptionswerte des Enzyms mit sich bringt. Abb. 5 zeigt die Kurven der Adsorption eines stark hefegummihaltigen Invertins vom Saccharasewert 0,16 an verschiedenen Tonerdesorten. Ihre Zahlen stammen aus der Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und H. KRAUT über ein Tonerdegel von der Formel $Al(OH)_3$[1]. Bei der Adsorption an die dort mit *C* bezeichnete Sorte [$Al(OH)_3$] sanken durch Verdünnen der Ausgangslösung auf das 10- bzw. 100fache die Adsorptionswerte (Kurve 1 bis 3), während bei dem viel wasserärmeren Aluminiumhydroxyd *B* der Einfluß der Verdünnung ein günstiger war (Kurve 4 unverdünnt, Kurve 5 aufs 10-, Kurve 6 aufs 100fache verdünnt). Die Verschiedenheit des Adsorptionsverhaltens diente in jener Arbeit als ein Beweis für die Verschiedenheit der untersuchten Tonerdepräparate.

III. Die Beurteilung der Reinheit von Enzympräparaten.

Die fortschreitende Reinigung eines Enzyms zeigt sich in der Erhöhung seiner enzymatischen Konzentration, das heißt in der Steigerung der Wirksamkeit einer gewissen Probemenge. Ein Aufschluß über die Verschiedenheit von Präparaten desselben Reinheitsgrades, aber ungleicher Herkunft, geben neben qualitativen Proben die Schwankungen in den Elementaranalysen, die mit den Präparaten angestellt wurden. Beide Fragen, sowohl nach der Gleichartigkeit wie nach der Reinheit, lassen sich durch die Betrachtung des Adsorptionsverhaltens auf direktem Wege entscheiden.

Die Kriterien der Reinheit sind der Verlauf der Adsorptionskurven und der Einfluß der Verdünnung, nach den [14] Gesichtspunkten, die wir unter I. und II. entwickelt haben. Dabei zeigt sich der Erfolg der Reinigungsprozesse am Anwachsen der Adsorptionswerte des Enzyms, schließlich an der Änderung des Charakters der Kurven. Wenn das Ziel der Reinigung erreicht ist, müssen wir die Adsorptionskurve eines reinen Stoffs erhalten, deren Verlauf unabhängig von der Anfangskonzentration der untersuchten Lösung sein muß und wahrscheinlich der Adsorptionsisotherme folgen wird.

Um die Adsorptionskurven verschiedener Präparate vergleichen zu können, muß man sich natürlich desselben Adsorptionsmittels und zwar aus einer einzigen Dar-

[1] Chem. Ber. Bd. 56, S. 149 [1923], und zwar S. 159.

[1]) Chem. Ber. Bd. 56, S. 1117 [1923], und zwar S. 1121.

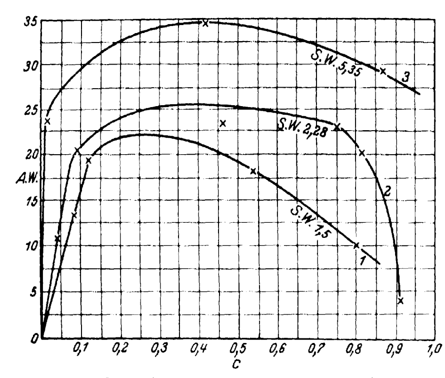


Abb. 6. Adsorptionskurven desselben Invertinpräparates in verschiedenen Reinheitsstufen.

stellung bedienen, da die Entwicklung der wirksamen Oberfläche selbst bei peinlichster Einhaltung der Darstellungsbedingungen erheblichen Schwankungen unterworfen ist. Zur Untersuchung einiger Präparate der vorangehenden V. Abhandlung über Invertin haben wir ein Tonerdegel von der Formel $Al(OH)_3$ verwendet, [15] das nach der Vorschrift von R. WILLSTÄTTER und H. KRAUT[1] dargestellt war. Die Kurven der Abb. 6 entsprechen drei verschiedenen Stufen in der Reinigung desselben Hefeautolysats. Die Anfangskonzentration betrug für alle Kurven 1 S.E. in 1 l. Bei Kurve 1 war der Reinheitsgrad (Saccharasewert) 1,5, bei der zweiten Kurve 2,28, während Kurve 3 einem Saccharasewert von 5,35 (= Zeitwert von 0,186) zukommt. Die Fortschritte der Reinigung zeigen sich sehr deutlich in der Steigerung der Adsorptionswerte, aber selbst das Präparat vom Saccharasewert 5,35, das alle seine Vorgänger an Reinheit übertrifft, zeigt noch den Abfall der Kurve bei höheren Konzentrationen der Restlösung, hat also, entsprechend dem analytischen Befund der vorangehenden Abhandlung, keineswegs das Verhalten eines reinen Stoffs. Diesem Abfall entspricht der in Abb. 7 dargestellte große Einfluß der Verdünnung (Kurven 1 und 3).

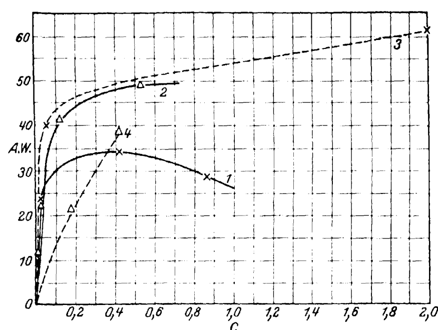


Abb. 7. Adsorption von Invertinpräparaten ähnlichen Reinheitsgrades
—— 1 S.E. in 1000 ccm. ----- 1 S.E. in 120 ccm.

Einem höheren Reinheitsgrad muß nicht notwendig auch [16] eine Kurve mit höheren Adsorptionswerten entsprechen. Es hängt ganz von der Art der Begleitstoffe ab, wie stark sie die Adsorption des Enzyms beeinflussen. Hierin liegt aber ein Mittel, über die Verschiedenheit mehrerer Präparate desselben Reinheitsgrades zu entscheiden. Da die Adsorbierbarkeit von Stoff zu Stoff verschieden ist, können nur ganz einheitlich zusammengesetzte Präparate dieselbe Adsorptionskurve ergeben. Die Kurven 1 und 2 der Abb. 7 zeigen die Adsorption zweier Präparate ähnlichen Reinheitsgrades, aufgenommen in einer Anfangskonzentration von 1 S.E. in 1000 ccm.

[1] Chem. Ber. Bd. 56, S. 1117 [1923], und zwar S. 1118.

Kurve 1 stammt von dem oben erwähnten Präparat mit dem Saccharasewert 5,35, Kurve 2 von einem solchen mit dem S.W. 4,2. Letzteres weist trotz seiner geringeren Reinheit durchwegs höhere Adsorptionswerte auf. Die Verschiedenheit der das Invertin begleitenden Fremdstoffe muß in diesem Fall eine recht erhebliche sein. Das beweisen die Veränderungen, welche die Adsorptionswerte der beiden Präparate durch Änderung der Anfangskonzentration erfahren. Kurven 3 und 4 erhielten wir bei einer Anfangskonzentration von 1 S.E. in 120 ccm. Bei dem Präparat vom S.W. 5,35 steigerte die Verdünnung die Adsorptionswerte, während sie bei dem anderen Präparate eine deutliche Abschwächung erfuhren. Die vorausgehende V. Abhandlung über Invertin ist zum selben Ergebnis gekommen, daß nämlich die zurzeit besten Invertinpräparate noch keineswegs eine einheitliche Zusammensetzung aufweisen.

IV. Adsorptionsversuche.

Während bei den Adsorptionsversuchen aus den ungereinigten Hefeautolysaten und auch aus den mit Kaolin vorgereinigten der Verlauf der Kurven ein durchaus kontinuierlicher war, zeigten sich bei den reineren Lösungen häufig so starke Abweichungen, daß nach einer Fehlerquelle unserer Bestimmungsmethode gesucht werden mußte.

Bekannt ist aus den vorhergehenden Abhandlungen über Invertin die Genauigkeit der Invertinbestimmung selbst; mit der empirischen Kurve des zeitlichen Verlaufs wird die Nulldrehungszeit mit einem Fehler von ±2% gefunden. Eine [17] zweite Fehlerquelle ist die Abmessung der Aluminiumhydroxydsuspensionen. Bekanntlich werden beim Abpipettieren von zähen kolloidalen Suspensionen leicht Fehler bis zu 10% beobachtet. Die von uns angewandten Suspensionen enthielten aber nur etwa 0,001 bis 0,0001 g Al_2O_3 in 1 ccm, eine Änderung der Viscosität des Wassers war also sicher nicht eingetreten. Wir prüften die Genauigkeit des Abmessens, indem wir dreimal je 5 ccm einer Aluminiumhydroxydsuspension, die wir zu unseren Bestimmungen verwendeten, abpipettierten und im Tiegel trockneten und glühten. Die Gewichte des Aluminiumoxyds waren 0,0065 — 0,0064 — 0,0064 g. Die Fehlergrenze beträgt also ±1%. Die wesentlich höheren Fehler unserer Bestimmungen konnten hiernach nur an einer unvollkommenen Trennung von Adsorbat und Restlösung liegen.

Die präparative Methode für diese Trennung ist das Zentrifugieren, das bei Tonerdeadsorbaten meist völlig klare Restlösungen liefert. Bei den kleinen, von uns verwendeten Proben und den hohen Adsorptionswerten der reineren Invertinlösungen bildete sich aber nur ein winziges Flöckchen am Boden der Zentrifugengläser, und wir konnten einige Male beobachten, daß sich davon beim Abgießen oder Abpipettieren der Restlösung ein Teil loslöste. Wir zogen deshalb eine Filtration dem Zentrifugieren vor, wobei natürlich die zum Benetzen der Filter dienenden ersten Anteile der Restlösungen stets verworfen werden mußten. Während beim Absaugen durch gehärtetes Filtrierpapier oft erhebliche Mengen des Adsorbats durchgerissen wurden, erwies sich die Filtration durch ein glattes, gehärtetes Filter als einwandfrei.

0,048 S.E. wurden fünfmal mit 0,00064 g Al_2O_3 in einen Meßkolben gegeben und auf 50 ccm aufgefüllt. Der Vergleichszeitwert für 10 ccm der filtrierten Restlösungen war 35,4 — 35,5 — 35,5 — 35,4 — 35,4 Minuten. Das entspricht einem Gehalt der Restlösung von 0,03405 bzw. 0,03390 S.E., die Fehlergrenze war also nicht größer als ±2%. Natürlich steigerte sie sich etwas, wenn gelegentlich ganz kleine Mengen von Tonerde verwendet wurden. Aber abgesehen von einigen wenigen Fällen, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf mangelhafte [18] Beschaffenheit der Filter zurückzuführen waren, ist bei unseren Bestimmungen eine für die Beurteilung der Kurven durchaus genügende Fehlergrenze von ±4% anzunehmen, zumal wir alle Restlösungen zweimal durch dasselbe Filter passieren ließen.

Eine sehr scharfe Bestimmung für kleine Spuren von Aluminiumhydroxyd fanden wir in der Methode von F. W. ATTACK[1], welche die Bildung eines roten Farblackes mit Alizarinrot-S als Erkennungsmittel verwendet. Wir änderten das Verfahren in der Weise ab, daß wir nur 1 Tropfen der 0,1proz. Alizarinrotlösung zu den Versuchsproben verwendeten und die essigsauren Probelösungen 2 bis 3 Tage stehen ließen. Dabei machten sich schon die kleinsten Spuren von Aluminiumhydroxyd als rote Flöckchen am Boden der Reagenzgläser bemerkbar. So konnten wir in den wenigen Fällen, welche zu niedrige Adsorptionswerte ergeben hatten, fast immer Spuren von Aluminiumhydroxyd in den Restlösungen, also ungenügende Abtrennung des Adsorbats nachweisen.

In der folgenden Tabelle finden sich die Versuchsdaten aller in den Abbildungen wiedergegebenen Kurven.

Tabelle.

Zu Abb. 1. 12 Monate altes Hefeautolysat (1 Teil Hefe und 1 Teil Wasser). Anfangskonzentration 1 S.E. in 10 l Wasser.

Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
S.E.	g Al_2O_3	ccm			
0,0234	0,00744	250	0,0191	2,6	0,017
0,0234	0,00528	250	0,0162	3,1	0,029
0,0234	0,00372	250	0,0102	2,7	0,053
0,0234	0,00186	250	0,0035	1,9	0,080

Zu Abb. 3. Glycerinextrakt aus Pankreasdrüsen, durch Adsorption in essigsaurer Lösung mit Aluminiumhydroxyd lipasefrei, durch Adsorption mit Kaolin trypsinfrei gemacht. Anfangskonzentration 40 Am.E. (Amylaseeinheiten) in 1 l.

[19]

Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte Am.E.	A.W.	c
Am.E.	g Al_2O_3	ccm			
4,00	0,40	100	3,91	9,8	0,9
4,00	0,20	100	3,72	18,6	2,8
4,00	0,04	100	2,01	50,2	19,9
4,00	0,02	100	1,49	74,5	25,1
4,00	0,01	100	0,97	97,0	30,3
4,00	0,005	100	0,58	116,0	34,2

[1] Chem.-Ztg. 1917, II. Bd., S. 177.

Zu Abb. 4. 10 Monate altes Hefeautolysat (1 Teil Hefe und 1 Teil Wasser), gereinigt durch Voradsorption mit 10% Kaolin. Anfangskonzentrationen 1 S.E. in 1, 2 und 4 l Wasser.

Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
S.E.	g Al_2O_3	ccm			
Kurve 1: 0,046	0,0372	50	0,011	0,62	0,46
0,046	0,0186	50	0,023	0,60	0,70
„ 2: 0,046	0,0372	100	0,0435	1,2	0,024
0,046	0,0279	100	0,0426	1,5	0,034
0,046	0,0186	100	0,038	2,1	0,080
0,046	0,0093	100	0,023	2,5	0,23
0,046	0,0047	100	0,008	1,7	0,38
„ 3: 0,046	0,0186	200	0,0445	2,4	0,0075
0,046	0,0093	200	0,037	4,0	0,045

Zu Abb. 5. Stark hefegummihaltiges, aber eiweißarmes Invertin vom S.W. 0,16. Aluminiumhydroxyd C nach B. 56, 1117, und Aluminiumhydroxyd B. nach B 56, 149. Anfangskonzentrationen von 1 S.E. in 100, 1000, 10000 ccm.

Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
S.E.	g Al_2O_3	ccm			
Al-Hydroxyd C:					
Kurve 1: 0,1046	0,0070	10	0,0979	14,0	0,67
„ 2: 0,0498	0,0139	50	0,0492	5,3	0,012
0,0498	0,0070	50	0,0485	7,0	0,026
0,0498	0,0023	50	0,024	10,1	0,53
0,0498	0,0012	50	0,010	8,9	0,79
„ 3: 0,0489	0,0046	500	0,030	6,5	0,039
0,0489	0,0037	500	0,022	6,0	0,054
0,0489	0,0028	500	0,018	6,6	0,061
0,0489	0,0018	500	0,014	7,8	0,070

[20]

Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
S.E.	g Al_2O_3	ccm			
Al-Hydroxyd B:					
Kurve 4: 0,102	0,0056	10	0,059	10,5	4,3
„ 5: 0,056	0,0093	50	0,052	5,5	0,08
0,056	0,0046	50	0,048	10,4	0,16
0,056	0,0028	50	0,034	12,2	0,44
0,056	0,0019	50	0,025	13,2	0,62
0,056	0,0009	50	0,004	4,4	1,04
„ 6: 0,054	0,0028	500	0,040	14,0	0,028
0,054	0,0019	500	0,032	17,0	0,044

Zu Abb. 6. Kurve 1: Kaolinpräparat der Tab. 11 der V. Abhandlung von S.W. 1,5.

Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
S.E.	g Al_2O_3	ccm			
0,0462	0,00306	50	0,0419	13,7	0,086
0,0462	0,00204	50	0,0402	19,7	0,12
0,0462	0,00102	50	0,0189	18,5	0,54
0,0462	0,00051	50	0,0052	10,3	0,80

Kurve 2: Präparat d der Tab. 11 der V. Abhandlung von S.W. 2,28.

Angewandte Mengen S.E.	Angewandte Mengen g Al_2O_3	Volumen ccm	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
0,0235	0,00204	25	0,0223	10,9	0,048
0,0235	0,00102	25	0,0212	20,8	0,093
0,0235	0,00051	25	0,0118	23,2	0,47
0,0235	0,00020	25	0,0047	23,0	0,75
0,0235	0,00015	25	0,0032	20,6	0,81
0,0235	0,00010	25	0,00045	4,4	0,92

Kurve 3: Präparat g8 der Tab. 11 der V. Abhandlung von S.W. 5,35.

Angewandte Mengen S.E.	Angewandte Mengen g Al_2O_3	Volumen ccm	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
0,02466	0,00102	25	0,02435	23,8	0,012
0,02466	0,00041	25	0,01414	34,5	0,42
0,02466	0,00010	25	0,00283	28,3	0,87

[21]
Zu Abb. 7. Kurve 1: Präparat g8, siehe Kurve 3 der Abb. 6. Anfangskonzentration 1 S.E. in 1000 ccm. Kurve 2: Präparat von S.W. 4,2. 12 Monate altes Hefeautolysat, gereinigt durch Alkoholfällung, Adsorption an Kaolin (Nr. 4 der Tab. 10 der V. Abh.), Adsorption an Aluminiumhydroxyd C, Adsorption an Aluminiumhydroxyd B. Anfangskonzentration 1 S.E. in 1000 ccm.

Angewandte Mengen S.E.	Angewandte Mengen g Al_2O_3	Volumen ccm	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
0,02329	0,00204	25	0,02320	11,4	0,0036
0,02329	0,00102	25	0,02277	22,3	0,021
0,02329	0,00051	25	0,02045	40,1	0,11
0,02329	0,00020	25	0,01010	49,5	0,53

Kurve 3: Präparat g8. Anfangskonzentration 1 S.E. in 120 ccm.

Angewandte Mengen S.E.	Angewandte Mengen g Al_2O_3	Volumen ccm	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
0,0822	0,00204	10	0,0817	40,0	0,05
0,0822	0,00102	10	0,0618	60,6	2,0

Kurve 4: Präparat der Kurve 2. Anfangskonzentration 1 S.E. in 120 ccm.

Angewandte Mengen S.E.	Angewandte Mengen g Al_2O_3	Volumen ccm	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
0,08384	0,00408	10	0,08202	20,1	0,18
0,08384	0,00204	10	0,07960	39,0	0,42

Zeitschrift für physiologische Chemie **142**, S. 71 [1925].

52. ÜBER ENZYMADSORPTION. II.

Von HEINRICH KRAUT und ERWIN WENZEL.

(VII. Abhandlung zur Kenntnis des Invertins von R. WILLSTÄTTER und Mitarbeitern.)

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 28. Oktober 1924.)

Die Isolierung von Enzymen stellt uns vor eine doppelte Aufgabe. Wir müssen zuerst die Enzyme aus der Verankerung an Protoplasmabestandteile der Organe und Sekrete, aus denen wir sie gewinnen wollen, freilegen und dann eine Trennung der Enzyme von allen bei diesem Prozeß in Lösung gegangenen Stoffen herbeiführen. Als geeignetste Methode für diesen zweiten Teil der Isolierung hat sich die von R. WILLSTÄTTER in der II. Abhandlung über Peroxydase[1] eingeführte Bindung der Enzyme an die Grenzfläche einer neuen Phase, die Adsorption erwiesen, mit deren Anwendung sich die vorliegende Untersuchung befaßt. Beide Aufgaben greifen aber vielfach ineinander. Die Freilegung des Invertins z. B. geschieht in den meisten Fällen durch den Prozeß der postmortalen Selbstauflösung. „Die Aufgabe ist, sie so zu leiten, daß die größte Menge von Invertin in Lösung gebracht wird, zusammen mit solchen Begleitstoffen, welche die Reinigung und Isolierung des **[72]** Enzyms am wenigsten stören[1])." Andererseits hat die Abtrennung der gleichzeitig in Lösung befindlichen Stoffe schon einzusetzen, bevor es gelungen ist, die Enzyme wirklich aus jeder Assoziation mit Fremdkörpern loszulösen. „Man findet sie in den aus tierischen und pflanzlichen Organen oder aus Pilzen gewonnenen Auszügen mit einem großen Vielfachen komplizierter organischer Verbindungen vergesellschaftet, nicht einfach im Zustand eines Gemisches, sondern durch Kräfte verbunden, wie sie auch in den Adsorptionsverbindungen mit unlöslichen Adsorbentien wirken[2])." Für solche Assoziationen der Enzyme haben R. WILLSTÄTTER und F. RACKE das Schema der Koadsorbentien[3]) aufgestellt, unter das alle diejenigen Stoffe fallen, welche infolge eines zwischen ihnen

[1] Liebigs Ann. der Chem. Bd. 422, S. 47 [1920/21].

[1]) R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Zur Kenntnis des Invertins, Liebigs Ann. der Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 4.

[2]) a. a. O. S. 56. [3]) a. a. O. S. 60.

und dem Enzym bestehenden Zusammenhangs gemeinsam mit dem Enzym in die Adsorbate gehen. Häufig fließen die beiden Aufgaben der Enzymisolierung in eine zusammen, indem das Adsorptionsmittel selbst die Affinitäten überwindet, welche das Enzym und seine Koadsorbentien zusammenhalten. Wir verdanken aber den Untersuchungen der nachfolgenden VIII. Abhandlung über Invertin von R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER die wichtige Erkenntnis, daß diese Affinitäten auch einen großen Grad von Festigkeit aufweisen können. Es ist ihnen gelungen, Invertinlösungen darzustellen, deren Adsorptionsverhalten dem einer einheitlichen Substanz ähnlich war, und die sich durch die chemische Analyse doch nur als ein zufälliges Gemenge von Invertin mit akzessorischen Begleitstoffen erwiesen. Wenn wir daher im folgenden von Enzymadsorption reden, so sind wir uns bewußt, daß es sich dabei sehr häufig nicht um die Bindung des Enzyms allein an die Oberfläche des Adsorbens handelt, sondern um die eines noch nicht zerlegten Konglomerats von Protoplasmabestandteilen und deren Abbauprodukten, unter denen eines das gesuchte und durch seine spezifische Reaktion nachweisbare Enzym ist. Es kommen auch Fälle vor, in denen
[73] die Loslösung des Enzyms aus einer Assoziation oder das Eingehen einer neuen während des Verlaufs der Reinigungsoperationen eintritt. Das bedingt natürlich eine weitgehende Änderung im Adsorptionsverhalten des Enzyms, und es wird manchmal möglich sein, eben aus einer sonst unerklärlichen Änderung einen Rückschluß auf eine solche Umgruppierung zu ziehen. So haben wir z. B. gefunden, daß das Invertinpräparat *C* der Tab. 8 der VIII. Abhandlung nach der Kaolinadsorption, welche bekanntlich den größten Teil des Hefegummis entfernt, schlechter an Tonerde adsorbierbar war als vor dieser Reinigungsoperation. Es zeigte sich, daß das Präparat nicht frei von tryptischer Wirkung war, und daß ein langsamer Eiweißabbau entweder die Assoziation des Invertins verändert oder aber eine Anzahl von Abbauprodukten geschaffen hatte, welche durch ihre starke Adsorbierbarkeit an Tonerde die Oberfläche beschlagnahmten und sich nicht mehr entfernen ließen.

Für die praktische Frage: wie soll man adsorbieren? spielen indes die erwähnten Komplikationen durch die Gegenwart der Koadsorbentien erst dann eine Rolle, wenn die mit dem Enzym nicht zusammenhängenden Stoffe durch geeignete Maßnahmen bereits entfernt sind. In einer ersten Abhandlung[1] hatten wir uns die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, wie weit sich der quantitative Verlauf der Enzymadsorption aus den Gesetzen erklären läßt, die man für die Adsorption beliebiger, aber untereinander nicht zusammenhängender Stoffe aufstellen kann. Diese Betrachtung ist natürlich einseitig und dann unzulänglich, wenn man das Adsorptionsverhalten der Enzyme selbst daraus ableiten will; aber eine derartige Vereinfachung kann doch eine Reihe von Erscheinungen erklären, und sie wird vor allem gute Dienste leisten bei der Lösung der Frage, wie man am zweckmäßigsten adsorbieren soll.

Die quantitative Betrachtung der Adsorption muß den Zusammenhang aufsuchen, der zwischen der Konzentration des zu adsorbierenden Stoffs im Adsorptionsmittel

[1] Diese Zs. Bd. 133, S. 1 [1924].

und derjenigen in der zurückbleibenden Lösung besteht. Erstere, die [74] Konzentration des Enzyms im Adsorbat, nennen wir den Adsorptionswert (A.W.), die Konzentration des Enzyms in der Restlösung bezeichnen wir mit c. In unseren Abbildungen sind die Adsorptionswerte als Ordinaten, die Konzentrationen der Restlösungen als Abszissen aufgetragen und zwar in Saccharaseeinheiten (S.E.) pro Gramm Adsorbens und pro Liter Restlösung. Der Adsorptionswert eines einzelnen gelösten Stoffes folgt der Freundlichschen Adsorptionsisotherme[1]; er wird eindeutig durch die Konzentration der Restlösung bestimmt und ist unabhängig von der der Anfangslösung. Die Adsorptionswerte eines Gemisches dagegen stellen den sehr variablen Schlüssel dar, nach dem sich die verschiedenen Stoffe in die Oberfläche des Adsorbens teilen, und es ist ausschlaggebend für diese Verteilung, mit welcher Stärke die einzelnen Stoffe gerade bei derjenigen Konzentration, die sie in der betreffenden Lösung haben, ihre Adsorbierbarkeit zum Ausdruck bringen.

Der Zusammenhang mit den Adsorptionsisothermen der einzelnen reinen Stoffe ist darin zu suchen, daß der Anspruch, den die Stoffe bei der Platzverteilung des Gemisches erheben, demjenigen Adsorptionswert parallel gehen wird, den sie als alleinige Lösungskomponenten bei derselben Konzentration ihrer Restlösung auf ihrer Adsorptionsisotherme haben würden. Daher ändert sich schon durch die Adsorption selbst der Verteilungsschlüssel durch die ungleichmäßige Änderung der Konzentration der verschiedenen Stoffe. Substanzen, welche für sich allein einen steilen Anstieg ihrer Adsorptionsisotherme schon bei niedrigen Konzentrationen der Restlösung aufweisen, werden natürlich in Gemischen dementsprechend selbst in kleinen Mengen viel Platz beanspruchen. Vermindert man die Restlösungskonzentrationen durch Wegadsorbieren oder durch Verdünnen einer gegebenen Lösung, so werden nach diesen Operationen diejenigen Stoffe bevorzugt adsorbiert werden, deren Adsorbierbarkeit durch die Abnahme der Konzentration die geringere [75] Schwächung erfährt. Das sind diejenigen Stoffe, deren Adsorptionsisotherme mit steilerem Anstieg das Maximum erreicht.

Diese Gesetzmäßigkeiten gestatten, aus dem Verlauf der Kurven, die den Zusammenhang der Enzymkonzentrationen im Adsorbat und in der Restlösung darstellen, auf die Art und Menge der Begleitstoffe einen Schluß zu ziehen, der als Wegweiser für die Enzymreinigung durch Adsorption dienen kann[1]). In den Untersuchungen der vorliegenden Abhandlung ist die Frage behandelt, welche Maßnahmen auf Grund des quantitativen Verlaufs der Adsorptionskurven am zweckmäßigsten ergriffen werden, um das Enzym von denjenigen Begleitstoffen zu befreien, die ohne Zusammenhang mit ihm sich in den Organextrakten finden. Die Operationen der Adsorptions-

[1] In unserer I. Abhandlung ist auf S. 3 bei der Wiedergabe der Adsorptionsformel ein (*im vorliegenden Abdruck berichtigter*) Druckfehler vorgekommen; sie muß richtig heißen:

$$a = \alpha \cdot c^{\frac{1}{n}}.$$

[1]) Zur Ausführung der Kurven siehe die I. Abhandlung über Enzymadsorption S. 3, 4, 16—18.

technik selbst sind alle bekannt und verwendet, nämlich die Herstellung einer geeigneten Anfangslösung und der richtigen Wasserstoffionenkonzentration, die Fraktionierung durch Vorwegnahme eines unreinen Anteils oder durch Übriglassen eines Restes und endlich der Wechsel im Adsorptionsmittel. Durch die quantitative Betrachtung aber sind wir imstande, genau anzugeben, wann und in welchem Maße die einzelnen dieser Operationen angesetzt werden sollen. Dadurch können wir die Adsorption so vollständig wie möglich zur Reinigung ausnützen und dazu noch erkennen, wann die Grenze der Reinigungsmöglichkeit erreicht ist. Wir führten unsere Untersuchung mit Invertin aus, wobei in den meisten Fällen Tonerde C nach R. WILLSTÄTTER und H. KRAUT[2], und zwar aus einer einzigen Darstellung, das Adsorptionsmittel bildete. Eine ausführlichere Schilderung unserer Ergebnisse findet sich in der Dissertation des einen von uns[3].

Wieder, wie in unserer ersten Arbeit genossen wir den Vorzug, die Präparate der gleichzeitigen Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER über Invertin benützen zu dürfen und unsere Resultate im Gang der präparativen Arbeit [76] kontrollieren zu können. Für das von Herrn Geheimrat R. WILLSTÄTTER unserer Arbeit entgegengebrachte Wohlwollen erlauben wir uns, unseren herzlichen Dank auszusprechen. Ferner ist es uns eine angenehme Pflicht, der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft und ihrem Japanausschuß unseren verbindlichsten Dank für die Gewährung eines Stipendiums zu sagen, mit dessen Hilfe die vorliegende Arbeit ausgeführt werden konnte.

I. Die Herstellung der günstigsten Anfangskonzentration.

Die häufigste Anwendung der Adsorption zu Reinigungszwecken ist die Entfernung einer gut adsorbierbaren Verunreinigung aus einer weniger leicht adsorbierbaren Hauptsubstanz. So reinigt man z. B. Zuckerlösungen mittels Tierkohle, indem die Verunreinigungen, in der Hauptsache Oxydationsprodukte der Zucker, wesentlich leichter von der Tierkohle aufgenommen werden als die Zucker selbst. Natürlich geht dabei auch ein kleiner Teil des Zuckers an das Adsorbens und damit verloren. Bei den Enzymen liegt der Fall umgekehrt. Hier werden die Hauptprodukte selbst an das Adsorptionsmittel gebunden, und es ist die Hauptaufgabe der Reinigung, sie möglichst auswählend aus der Fülle der mehr oder minder gut adsorbierbaren Begleitstoffe herauszuholen. Während bei der zuerst erwähnten Reinigung die Bindung aller Stoffe an das Adsorbens, also der Verlust an Zucker gar nicht ins Gewicht fällt, ist es bei den Enzymen eine besondere Schwierigkeit, daß von den üblichen Adsorbentien die meisten Abbauprodukte des Protoplasmas in hohem Maße festgehalten werden. Ferner hängt es mit dem steilen Anstieg der Adsorptionsisothermen zusammen, daß gerade die letzten Reste von Stoffen bei der Adsorption wieder und wieder aufgenommen werden. Natürlich ist es am zweckmäßigsten, Adsorbentien aufzusuchen, die einen

[2] Chem. Ber. Bd. 56, S. 1117 [1923]. [3] Diss. E. WENZEL, München 1924.

Teil der Begleitstoffe gar nicht aufnehmen oder die nur einen Teil der Begleitstoffe, nicht aber die Enzyme adsorbieren. Solche Fälle sind selten gefunden worden; ein Beispiel ist das Kaolin, das den Hefegummi, einen sonst sehr zähen Begleiter des Invertins fast nicht adsorbiert und daher das beste Mittel zu seiner Abtrennung ist. Eine Auswahl unter den mit dem Enzym zusammen [77] adsorbierten Stoffen kann bei der Verschiedenheit ihres Adsorptionsverhaltens nicht in einer einzigen Operation zum Ziele führen, sondern man muß versuchen, ihre Zahl durch den Wechsel der Bedingungen in aufeinander folgenden Adsorptionen mehr und mehr einzuengen. Die Adsorptionskurven, welche wir zur Auswahl dieser Maßnahmen betrachten, sind entstanden durch das Zusammenwirken aller der meist sehr zahlreichen Stoffe, welche überhaupt aus der Lösung vom Adsorbens aufgenommen werden. Häufig wird aber für das Bild der Kurven der Einfluß einer bestimmten Gruppe überwiegend sein; diese abzutrennen ist dann unsere erste Aufgabe. Ist einmal ein solches Überwiegen nicht vorhanden, so läßt sich doch meist aus den Veränderungen, welche die Adsorptionskurve durch eine einmalige Adsorption und Elution erfährt, die Zweckmäßigkeit neuer Variationen erkennen.

Das Ziel jeder Reinigung durch Adsorption muß eine Lösung sein, welche die Adsorptionskurve des Enzyms als die eines reinen Stoffes ergibt. Für die auszuwählenden Maßnahmen gilt in den meisten Fällen als Richtschnur der von R. Willstätter und F. Racke in der ersten Abhandlung über Invertin ausgesprochene Satz[1]: „Daher wird das Invertin, je weniger Aluminiumhydroxyd man braucht, um eine gegebene Menge desselben zu adsorbieren, in desto reinerem Zustande dadurch erhalten. Die zur Adsorption des Invertins erforderliche Menge von Aluminiumhydroxyd ist ein gewisses Maß seiner Selektivität." In der quantitativen Betrachtung bedeutet dieser Satz, daß man eine gegebene Enzymlösung mit möglichst hohen Adsorptionswerten adsorbieren soll.

Das erste Mittel zur Steigerung der Adsorptionswerte ist die Einstellung der günstigsten Anfangskonzentration. Wir haben in unserer ersten Abhandlung auseinandergesetzt, in welcher Weise sich die Adsorption eines Gemisches mit der Anfangskonzentration ändert. Das Resultat läßt sich dahin zusammenfassen, daß in konzentrierter Lösung die Adsorption der Stoffe mit langsamerem Anstieg der Adsorptionsisothermen, [78] also die der schlecht adsorbierbaren gefördert wird und umgekehrt. So wird fast immer bei der ersten Adsorption eines Autolysats aus verdünnter Lösung das Enzym bevorzugt, weil sich hier neben dem Enzym die schlecht adsorbierbaren Stoffe in großer Zahl vorfinden. Aber schon nach einer einzigen Adsorption aus verdünnter Lösung ändert sich meist das Bild. Die schlecht adsorbierbaren Stoffe sind zurückgeblieben und die Adsorptionskurve des Gemisches weist nun in der Hauptsache den Einfluß der besser adsorbierbaren Stoffe mit den steiler ansteigenden Adsorptionsisothermen auf. Um bei der nächsten Reinigungsmaßnahme deren Adsorption möglichst zurückzudrängen, müssen wir daher aus konzentrierter

[1] a. a. O., S. 66.

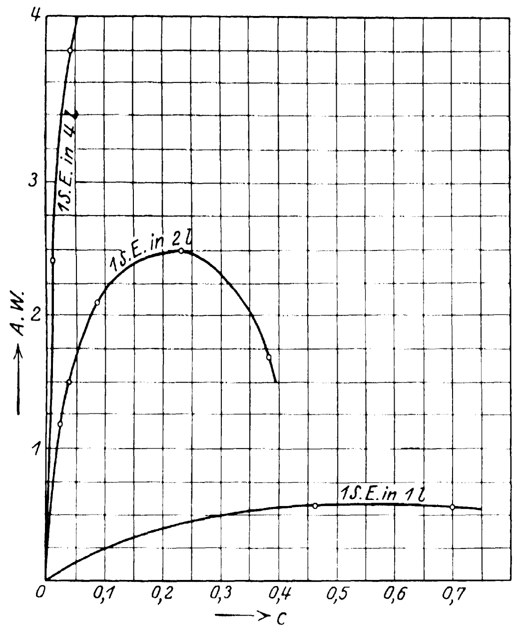


Abb. 1. Verdünnen der Anfangslösung verbessert die Adsorption eines durch Voradsorption mit Kaolin gereinigten Autolysats. Anfangskonzentrationen 1 S.E. in 1, 2 und 4 Liter. Adsorptionskurven an Tonerde C.

Lösung [79] adsorbieren. In der vierten Abhandlung über Invertin[1] ist das Adsorbieren der Autolysate aus verdünnter Lösung in den präparativen Reinigungsgang eingeführt worden. Als besonders gutes Beispiel bringen wir in Abb. 1 nochmals die in unserer ersten Abhandlung Abb. 4 dargestellten Kurven. Schon ihr Verlauf (besonders bei Kurve 2) zeigt am Abfall der Adsorptionswerte in hohen Restlösungskonzentrationen den Einfluß der in überwiegender Menge vorhandenen schlecht adsorbierbaren Stoffe. Entsprechend groß ist die Steigerung der Adsorptionswerte und damit der Selektion durch das Verdünnen.

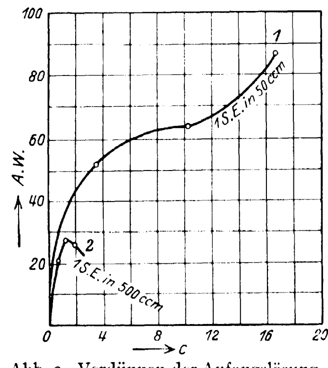


Abb. 2. Verdünnen der Anfangslösung schädigt die Adsorption eines Kaolinpräparates.

Schon bei den durch eine Adsorption an Kaolin mit folgender Elution und Dialyse gereinigten Präparaten liegen meist die Adsorptionswerte bei denselben Restlösungskonzentrationen höher, wenn sie aus konzentrierteren Anfangslösungen adsorbiert werden. Abb. 2 stellt die Adsorption

[1] R. WILLSTÄTTER und W. WASSERMANN, Diese Zs. Bd. 123, S. 181 [1922].

eines Kaolinpräparates vom S.W. 1,8 an Tonerde C dar mit den Anfangskonzentrationen 1 S.E. in 50 und in 500 ccm. Der Abfall der Adsorptionswerte in der verdünnten Lösung ist sehr deutlich und schon aus der Form der Kurven zu erwarten.

[80] Tabelle 1.

Gealtertes Hefeautolysat, gereinigt durch Adsorption an Kaolin, eiweiß- und hefegummihaltig, S.W. 1,82 (siehe Abschn. III, C der VIII. Abh.).

Adsorptionskurven an Tonerde C. Anfangskonzentrationen 1 S.E. in 50 und in 500 ccm.

	Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	ε
	S.E.	g Al_2O_3	ccm			
1.	0,505	0,008	25	0,417	52	3,5
	0,505	0,004	25	0,253	63	10,1
	0,505	0,001	25	0,087	87	16,7
2.	0,0505	0,0015	25	0,0317	21	0,75
	0,0505	0,00063	25	0,0176	28	1,32
	0,0505	0,00036	25	0,0097	27	1,63

Ein Schluß auf die Wirkung der Konzentrationsänderung läßt sich aber nicht immer zwingend aus der Form der Kurven ziehen. Die Überlagerung verschiedenster Einflüsse, z. B. auch die Änderung der Assoziation der Enzyme durch Verdünnen, lassen es als notwendig erscheinen, jedesmal durch besondere Versuche die günstigste Anfangskonzentration festzustellen. Dazu genügt es natürlich nicht, je einen beliebigen Punkt in jeder geprüften Verdünnung zu bestimmen, da über deren Lage auf ihren Kurven nichts bekannt ist. Andererseits ist es nicht notwendig, in jeder Anfangskonzentration eine ganze Kurve aufzunehmen. Wenn in einer Konzentration eine vollständige Kurve von eben beginnender bis zu fast quantitativer Adsorption vorliegt, so lassen sich die nötigen Schlüsse über die Veränderungen in anderen Anfangskonzentrationen schon aus der Lage einzelner Stichproben zu dieser Kurve ziehen.

II. Der Einfluß der Reaktion des Mediums.

Es ist bekannt, daß für jede Adsorption eine optimale Reaktion des Mediums besteht. Die Bindung des Invertins an Kaolin wird stets in saurer Lösung vorgenommen. Für verdünnte Lösungen gealterter Autolysate verwenden R. WILLSTÄTTER und W. WASSERMANN[1] schwach saure Reaktion, für [81] konzentrierte fanden es R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER[1]) zweckmäßig, so sauer zu adsorbieren, als das Invertin eben noch erträgt. Für die Adsorption an Tonerde empfehlen R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[2]) als Bestes die schwach saure Reaktion der nicht neutralisierten Hefeautolysate. H. v. EULER und K. MYRBÄCK[3]) haben die Adsorption an Tonerde in verschiedenen mit Puffer eingestellten Aciditäten betrachtet und kamen zu dem

[1] IV. Abhandlung, S. 186.

[1]) V. Abhandlung, S. 195. [2]) I. Abhandlung, S. 69.

[3]) Diese Zs. Bd. 127, S. 115 [1923].

Resultat, daß ein p_H von 5,5 bis 6,5 die Adsorption am günstigsten beeinflußt. Auch unsere quantitativen Untersuchungen haben ergeben, daß für die Adsorption des Invertins an Tonerde C in den meisten Fällen ein ziemlich breites Maximum in schwach saurem Gebiet existiert. Die Abb. 3 und die Tab. 2 geben unsere Resultate mit einem gealterten Autolysat wieder, das durch Adsorption an Kaolin gereinigt, stark eiweiß-, aber schwach hefegummihaltig war, unter Zusatz von Essigsäure zur neutralen (dialysierten) Lösung. War die Adsorptionsflüssigkeit, welche 1 S.E. in 600 ccm enthielt, n/100 essigsauer, so konstatierten wir schon eine Verbesserung gegenüber der neutralen Lösung. Geringere Zusätze an Essigsäure hoben aber die Adsorptionswerte ganz bedeutend. Am günstigsten erwies sich hier eine Ausgangslösung, welche n/5000-essigsauer war.

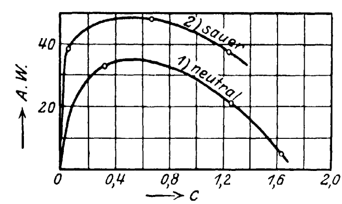


Abb. 3. Schwachsaure Reaktion begünstigt die Adsorption eines Kaolinpräparates aus gealtertem Hefeautolysat.

Abb. 4 und Tab. 3 zeigen die Adsorptionswerte an je derselben Menge Tonerde in verschiedenen Aciditäten, und [82] zwar befand sich bei Kurve 1 1 S.E. in 125, bei Kurve 2 1 S.E. in 600 ccm. (Der Einfluß der Anfangskonzentration wird also durch das Ansäuern nicht aufgehoben.)

Tabelle 2.
Gealtertes Hefeautolysat, gereinigt durch Adsorption an Kaolin, eiweißhaltig, schwach hefegummihaltig.
Adsorptionskurven an Tonerde C.
Anfangskonzentration 1 S.E. in 600 ccm. 1. aus neutraler, 2. aus n/5000-essigsaurer Lösung.

	Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
	S.E.	g Al_2O_3	ccm			
1.	0,0418	0,00104	25	0,0341	32,8	0,31
	0,0418	0,00052	25	0,0107	20,6	1,24
	0,0418	0,00030	25	0,0015	4,8	1,62
2.	0,0418	0,00104	25	0,0405	39,0	0,05
	0,0418	0,00052	25	0,0254	48,7	0,66
	0,0418	0,00030	25	0,0113	37,7	1,22

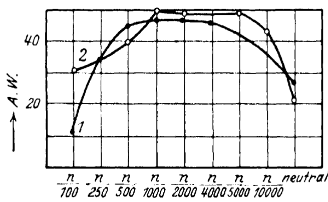


Abb. 4. Adsorptionswerte an derselben Menge Tonerde in verschiedenen Aciditäten.

Tabelle 3.
Präparat der Tabelle 2.
1. Anfangskonzentration 1 S.E. in 125 ccm.
Angewandt 0,0823 S.E. und 0,00156 g Al_2O_3 in 10 ccm.

Acidität der Lösung	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
n/100	0,0172	11,0	6,51
n/250	0,0537	34,4	2,86
n/500	0,0692	44,4	1,30
n/1000	0,0719	46,0	1,03
n/2000	0,0723	46,3	1,00
n/4000	0,0708	45,4	1,15
neutral	0,0433	27,7	3,90

[83]
2. Anfangskonzentration 1 S.E. in 600 ccm. Angewandt 0,0418 S.E. und 0,00052 g Al_2O_3 in 25 ccm.

Acidität der Lösung	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
n/100	0,0153	30,3	0,99
n/500	0,0204	39,3	0,86
n/1000	0,0256	49,2	0,65
n/2000	0,0253	48,7	0,66
n/5000	0,0254	48,7	0,66
n/10000	0,0223	42,0	0,78
neutral	0,0107	20,6	1,24

Ähnliche Resultate hatten alle Bestimmungen, die mit Präparaten aus gealterten Autolysaten gemacht wurden. Diese Präparate enthalten alle noch Eiweiß, aber keinen oder nur Spuren von Hefegummi. Man kann für sie allgemein, wie es auch in der präparativen Arbeit ausgeführt wurde, einen Zusatz zur neutralen Lösung, der sie n/1000-essigsauer macht, als annähernd optimal ansehen. Auch von Präparaten aus jungen Autolysaten gilt dasselbe in reinerem Zustand; im Anfangsstadium ergeben sich manchmal Ausnahmen. Ein Präparat, das eiweißfrei, aber stark hefegummihaltig war (1. Präparat der Tab. 4), hatte das Maximum der Adsorption in alkalischer

Tabelle 4.

1. Präparat (Beispiel des Abschnitts II, A der VIII. Abhandlung) enteiweißt, stark hefegummihaltig. — Angewandt 0,050 S.E. und 0,00208 g A_2lO_3 in 25 ccm.

Reaktion der Lösung	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
n/10-essigsauer	0,018[1]	8,7	0,95
n/100- ,,	0,021[2]	10,1	1,08
n/500- ,,	0,022	10,9	1,09
neutral	0,023	11,2	1,03
n/500-Na-Acetat	0,026	12,6	0,89
n/100- ,,	0,031	15,1	0,68
n/10- ,,	0,025	12,0	0,99

[84]
2. Präparat (Beispiel des Abschnitts I, C der VIII. Abhandlung) mit Alkohol gefällt, aber noch nicht enteiweißt. — Angewandt 0,125 S.E. und 0,0204 g Al_2O_3 in 25 ccm.

Acidität der Lösung	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
n/500	0,100	19,5	1,02
n/1000	0,087	16,9	1,55
neutral	0,052	10,6	2,93

Lösung (n/100-Natriumacetat), ein anderes, welches noch nicht enteiweißt war, wurde dagegen am besten aus n/500-essigsaurer Lösung aufgenommen (2. Präparat der Tab. 4). Allerdings zeigte hier eine elektrometrische p_H-Bestimmung, daß die n/1000-essigsaure Lösung noch völlig neutral reagierte ($p_H = 7,0$), verursacht wohl durch die starke Pufferwirkung der Eiweißstoffe. Beim Maximum von n/500-Essigsäure war dann $p_H = 5,3$.

Bei der Ausführung dieser Bestimmung ergab sich eine technische Schwierigkeit. Die gehärteten Filter (Schleicher und Schüll 602), die wir zur völligen Klärung der

[1] 16% zerstörtes Invertin wurden vom angewandten abgezogen.
[2] 4% desgleichen.

Restlösungen verwandten[1], adsorbierten nämlich in saurer Lösung so große Enzymmengen, daß sie die Resultate völlig verschleierten. So nahm ein Filter von 9 cm Durchmesser aus einer n/10-essigsauren Lösung von 0,23 S.E. in 25 ccm 0,10 S.E. = 43 % des angewandten auf. Bei geringerer Essigsäurekonzentration war die Adsorption durch die Filter allerdings wesentlich geringer, z. B. 13 % aus n/500-essigsaurer Lösung unter sonst denselben Bedingungen. Es genügte daher zur Ausschaltung dieses Fehlers, daß wir uns eine kleine, zerlegbare Glasnutsche von nur 2 cm Filterdurchmesser konstruierten, deren Adsorption in Kontrollversuchen 1 bis 2, allerhöchstens 4 % betrug.

Man kann die Frage aufwerfen, worin die Wirkung der verschiedenen Zusätze an Säure oder Alkali auf die Adsorptionen besteht. Sie scheint uns aber in dem unreinen Zustand, in dem die Enzyme vorliegen, noch gar nicht lösbar. Natürlich besitzt das Invertin als Kolloid ein p_H-Optimum seiner Fällbarkeit. [85] Dieses Optimum braucht aber nicht notwendig mit dem Minimum der Löslichkeit der Adsorptionsverbindung Invertin–Tonerde zusammenzufallen. Durch noch unveröffentlichte Versuche von H. KRAUT und F. EICHHORN wurde festgestellt, daß das Maximum der Adsorption von isoliertem Hefegummi an Tonerde C ebenfalls im schwach sauren Gebiet liegt. Danach ließe sich vielleicht das erwähnte alkalische Optimum der Invertinadsorption (Tab. 4, 1.) als Minimum der Adsorption des im Übermaß vorhandenen Hefegummis erklären. Sicherlich werden durch das Ansäuern auch häufig die Beziehungen der Enzyme zu ihren Koadsorbentien stark verändert. In Abb. 5 und Tab. 5 stellt die Kurve 1 die Adsorption des Kaolinpräparates aus gealtertem Autolysat in n/1000-Essigsäure dar, welche wir in neutraler Lösung durch Abb. 2 und Tab. 1 beschrieben haben.

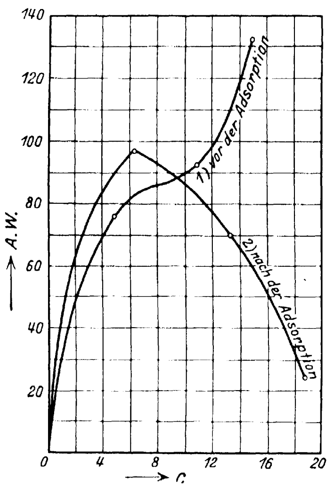


Abb. 5. Die Assoziation des Invertins wird während der Adsorption an Tonerde aus saurer Lösung deutlich verändert.

Die Kurve 2 ist in derselben Anfangskonzentration und Acidität aufgenommen wie Kurve 1, aber nachdem das Präparat einer Adsorption an Tonerde C aus n/1000-essigsaurer Lösung unterworfen worden war. Das Bild der [86] Adsorption ist so völlig verändert, daß der Schluß auf eine Veränderung des Assoziationskomplexes zwingend erscheint. Erschwerend für die Aufklärung dieser Erscheinungen tritt noch hinzu, daß alle Zusätze zu den Adsorptionsflüssigkeiten, also auch die zur Einstellung einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration gemachten, selbst wieder adsorbiert werden und dadurch das Bild verschieben.

[1] Siehe die I. Abhandlung über Enzymadsorption, S. 17.

Tabelle 5.
Präparat der Tabelle 1.
Anfangskonzentration 1 S.E. in 50 ccm.
Adsorptionskurven in $^{n}/_{1000}$-essigsaurer Lösung an Tonerde C.
1. Nach der Adsorption an Kaolin.
2. Nach der folgenden Adsorption an Tonerde C.

	Angewandte Mengen S.E.	Angewandte Mengen g Al_2O_3	Volumen ccm	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
1.	0,202	0,0020	10	0,153	76	4,9
	0,202	0,0010	10	0,092	92	11,0
	0,202	0,0004	10	0,054	133	14,8
2.	0,205	0,0015	10	0,143	96	6,2
	0,205	0,0010	10	0,070	70	13,5
	14,23	0,027	725	0,66	24	18,7

Wenn sonach das Optimum der Adsorption bald von der Mischung des Enzyms mit chemisch nicht verwandten Begleitstoffen, bald von dem Wechsel seiner Assoziationen ausschlaggebend verändert wird, so erscheint es zwecklos, etwa durch genaue p_H-Messungen der Ursache dieses Optimums als einer Eigenschaft der Enzyme selbst nachgehen zu wollen. Ja, es ist nicht einmal sicher, ob der großen Steigerung der Adsorptionswerte durch Einstellen der optimalen Reaktion immer eine entsprechende Reinigungswirkung parallel geht. Die gegenüber den alten Präparaten überaus hohen Adsorptionswerte von über 200, welche die reinsten Präparate der VIII. Abhandlung bei optimaler Reaktion aufweisen, sind keineswegs von einer entsprechenden Steigerung der Reinheitsgrade (Saccharasewerte) begleitet. Trotzdem ist es sicher, daß die Zusätze von Säure und Alkali bei der Adsorption uns in vielen Fällen ein [87] brauchbares Mittel der Fraktionierung an die Hand geben. Es wird aber verfehlt sein, den Reinigungserfolg immer nur in der Richtung der Adsorptionswertsteigerung zu suchen.

III. Fraktionierte Adsorption.

Betrachten wir die Adsorptionswerte der Kurve 2 in Abb. 5, so finden wir, daß nach einem steilen Anstieg mit steigender Restlösungskonzentration bis zu einem Maximum von fast 100 S.E. in 1 g Tonerde die Kurve wieder bis zu einem A.W. von nur 25 Einheiten pro Gramm Adsorbens bei einer Restlösungskonzentration von 18 S.E. pro Liter absinkt. Es nehmen also die ersten Anteile der zugesetzten Tonerde einen wesentlich geringeren Betrag von Invertin auf als die späteren, dafür aber um so mehr von den Begleitstoffen. In unserem Beispiel sind zur Adsorption von 80 % der vorhandenen 14,2 S.E. 0,105 g Al_2O_3 nötig, der vierte Teil davon adsorbiert aber nicht 20 %, sondern noch nicht einmal 5 % (0,66 S.E.). Es erweist sich daher als zweckmäßig, hier die oft gebrauchte Methode der Voradsorption anzuwenden, indem man mit einer geringen Menge Adsorbens viel Begleitstoffe und wenig Enzym adsorbiert, die verworfen werden. Und man ersieht aus dem steilen Abfall der Kurve 2 nach rechts ohne weiteres, daß es stets zweckmäßiger ist, zweimal mit einer kleinen Menge Tonerde vorzuadsorbieren als einmal mit der doppelten. Wir führten das in unserem Beispiel zweimal mit 0,027 g Al_2O_3 aus und verloren zusammen 11 % des vorhandenen

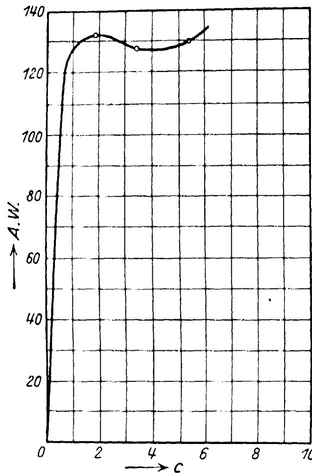


Abb. 6. Durch Voradsorption wird die Adsorptionskurve des Präparates 2 der Abb. 5 bedeutend verbessert.

Invertins. Den Erfolg der Voradsorption zeigt die nunmehr in einer Anfangskonzentration von 1 S.E. in 100 ccm aufgenommene Kurve der Abb. 6 und Tab. 6. (Da die Voradsorptionen das Volumen vermehrten, hätten wir das Präparat eindampfen müssen, um die neue Kurve in derselben Anfangskonzentration der Kurve 2 Abb. 5, nämlich 1 S.E. in 50 ccm, aufnehmen zu können. Sie wäre dann, wie die eine in noch größerer Verdünnung ausgeführte Bestimmung zeigt, nur noch günstiger ausgefallen.)

Die Verbesserung der Adsorptionswerte ist groß und vor allem ist die Gestalt der Kurve der einer einheitlichen Substanz viel mehr angenähert: rascher Anstieg schon bei [88] niedrigen Konzentrationen der Restlösung, dem im geprüften Gebiet kein Abfall mehr folgt.

Tabelle 6.

Präparat der Tabelle 1, nach Absorption an Kaolin und Tonerde C zweimal mit Tonerde C voradsorbiert.

Anfangskonzentration 1 S.E. in 100 ccm. Adsorptionskurve in n/1000-essigs. Lösung an Tonerde C.

Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
S.E.	g Al_2O_3	ccm			
0,1023	0,00063	10	0,0832	132	1,9
0,1023	0,00054	10	0,0689	128	3,3
0,1023	0,00038	10	0,0493	130	5,3

Dieser starke Reinigungseffekt der Voradsorption hat verschiedene Ursachen. Nicht nur ist ein Teil der Begleitstoffe, welche den Adsorptionswert des Invertins herabgedrückt haben, völlig entfernt worden, sondern es ist auch durch die [89] Konzentrationsverminderung dieser Begleitstoffe das Invertin selbst bei erneuter Adsorption in der Verteilung auf der Adsorbensoberfläche wesentlich bevorzugt. Noch aus einem dritten Grund ist aber die Voradsorption zweckmäßig. Es ist nämlich die Adsorption des zu reinigenden Stoffes durchaus ungeeignet zur Entfernung kleiner Reste von Begleitstoffen. Die Form der Adsorptionsisothermen lehrt, daß gerade solchen Resten noch ein unverhältnismäßig hoher Betrag an Adsorbierbarkeit zukommt. Daher ist aber zu ihrer Entfernung eben die Voradsorption, welche den zu reinigenden Stoff in der Lösung zurückläßt, besonders geeignet. Sie bietet außerdem den großen Vorteil, daß ihre Anwendung mit geringen Enzymverlusten verbunden ist, und daß die Ursache dieser Verluste einwandfrei feststeht. Im Gegensatz dazu sind die Ursachen der meist viel größeren Verluste der auf eine Reinigung durch Adsorption folgenden Elution und Dialyse selten einwandfrei festzustellen (mechanischer

Verlust oder Zerstörung?). Die Voradsorption ist daher unbedingt in allen den Fällen vorzunehmen, wo mit steigender Konzentration der Restlösung ein steiler Abfall der Adsorptionswerte eintritt. Auch ohne steilen Abfall ist sie namentlich in höheren Reinheitsgraden zur Entfernung kleiner Reste von Begleitstoffen empfehlenswert. Gänzlich vermieden werden muß sie nur bei den Präparaten, bei denen ein starker Anstieg der Adsorptionswerte gerade in den höchsten Restlösungskonzentrationen einsetzt, weil dann das reinere Enzym vorweg adsorbiert würde. Ein solches Beispiel zeigt Abb. 5, Kurve 1. Aber die dem Reinigungsgang desselben Präparates entnommene Kurve 2 lehrt, daß die Gelegenheit zur Anwendung der Voradsorption sich noch in einem späteren Stadium einstellen kann. Weitere Beispiele für die Wirkung der Voradsorption finden sich in den Kurven, welche den Reinigungsgang der Präparate in der folgenden VIII. Abhandlung über Invertin, Abschnitt ID, begleiten.

Den Gegensatz zur Voradsorption bildet eine Fraktionierung, die mit einem Rest des Enzyms einen größeren Teil der Begleitstoffe in der Restlösung zurückläßt. Diese Fraktionierung soll bei jeder richtig geleiteten Adsorption stattfinden, [90] wobei man durch Betrachtung der Adsorptionskurve feststellt, bis zu welchem Grade die Adsorption des Enzyms auswählend verläuft. Der Anstieg der Adsorptionskurven ist in den meisten Fällen nicht so steil, wie es die Adsorptionsisotherme der reinen Enzyme verlangen würde. Das bedeutet, daß sich zwischen dem Maximum der Adsorptionskurve und ihrem Ursprung (d. h. der quantitativen Adsorption) das Verhältnis der adsorbierten Stoffe dauernd zuungunsten des Enzyms verschiebt. Es ist daher notwendig, die Adsorption, je nach dem Maximum der Adsorptionswerte, bei 80 bis 95% der gesamten Enzymmenge abzubrechen.

Ein weiteres Moment der Enzymreinigung ist die Fraktionierung, welche sich fast immer bei der Elution beobachten läßt. Sie ist mit der Voradsorption in eine gewisse Parallele zu stellen. Die Elution stört nämlich einen Teil des Adsorbens oder seiner Oberfläche und ist in ihrer Wirkung oft einer Herabsetzung der Adsorbensmenge gleichzusetzen. Der noch wirksame Teil übt nun in der Elutionslösung eine Art Voradsorption aus, die sowohl kleine Reste von Begleitstoffen endgültig beseitigt, als auch einen Teil der in größerer Menge vorhandenen festhält. Ein Zeichen dafür ist die häufige Erfahrung, daß bei der Elution des Invertins aus Tonerdeadsorbaten durch Diammoniumphosphat die ersten eluierten Anteile anders zusammengesetzt und zwar meist reiner sind als die durch lange Einwirkung des Eluens entstehende Restelution. Das Phosphat wirkt anfangs dadurch eluierend, daß es die Oberfläche des Adsorbens besetzt und die adsorbierten Stoffe verdrängt. Dabei behalten diese immer noch einen kleinen Teil der Oberfläche inne. Bei längerem Stehen tritt aber eine Verwandlung des Aluminiumhydroxyds in ein Aluminiumphosphat von wahrscheinlich sehr viel gröberem Bau ein, welches fast keine adsorbierende Wirkung mehr ausübt. Dadurch begibt sich auch noch der Rest der adsorbierten Stoffe in Lösung, und die fraktionierende Wirkung der Elution wird aufgehoben.

Im Anschluß an diese Fraktionierungen bleibt noch der Reinigungseffekt zu

besprechen, der durch das Auswaschen der Adsorbate bewirkt wird. Jedes Auswaschen ist einer neuen [91] Adsorption zu vergleichen, da sich mit dem Waschwasser wieder ein Adsorptionsgleichgewicht einstellen muß. Bei der Adsorption eines einzelnen Stoffes würde das Auswaschen daher ziemlich verlustreich sein; bei einem Gemisch aber werden von dem Verlust fast nur die schlecht adsorbierbaren Stoffe betroffen. Durch ihr Verschwinden steigert sich der Raum, der den übrigen zur Verfügung steht, so daß ihre Adsorption aus dem Waschwasser tatsächlich mit überschüssigem Adsorptionsmittel vorgenommen wird. Zur Prüfung der Gleichgewichtseinstellung haben wir einen Versuch angesetzt: 3,1 S.E. aus einem gealterten, mit Kaolin etwas vorgereinigten Hefeautolysat wurden mit 15 g Tonerde aus 3 l Flüssigkeit adsorbiert, wobei 0,8 S.E. in der Restlösung blieben (also A.W. = 0,15). Wir wuschen einmal mit 1 l, dann wiederholt mit 2 l Wasser. Das erste Waschwasser enthielt noch 0,036 S.E. in 1 l, das zweite nur 0,003 S.E. in 2 l, vom dritten ab war kein Invertin mehr nachzuweisen. Als wir nun dasselbe Präparat nach Elution und Dialyse nochmals mit dem sehr viel höheren A.W. 15 adsorbierten, blieb im Waschwasser vom zweiten bis zum zehnten Mal die Konzentration von 0,0003 S.E. pro Liter fast konstant. Während also im ersten Falle durch das Waschen so viel Begleitstoffe entfernt wurden, daß vom dritten Mal ab die Invertinadsorption aus dem Waschwasser quantitativ war, ließ sich im nächsten Reinigungsstadium die Einstellung eines Gleichgewichts deutlich konstatieren.

Es ist nach diesen Erfahrungen notwendig, in den ersten Reinigungsstadien die Adsorbate mehrfach, d. h. mindestens dreimal mit reichlichem Wasser auszuwaschen. Ein einmaliges Waschen, das sicher wenig verlustreich ist, sollte aber auch bei reineren Adsorbaten angewandt werden.

IV. Der Wechsel im Adsorptionsmittel.

Bei rationeller Anwendung der beschriebenen Adsorptionsmethoden erhält man schließlich eine Lösung, deren Adsorptionskurve nicht mehr viel von der eines einzelnen

[92]

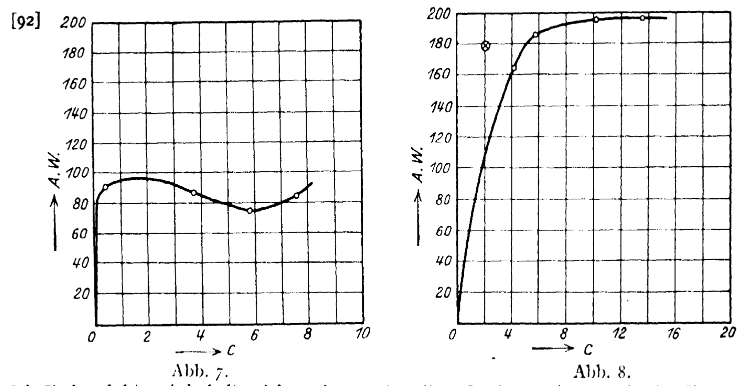


Abb. 7. Abb. 8.

Die Endprodukte wiederholter Adsorption an dasselbe Adsorbens zeigen starke Annäherung an die Form der Adsorptionsisotherme.

Tabelle 7.
Präparat D der Tabelle 8 der VIII. Abh. vom S.W. 6,7.
Anfangskonzentration 1 S.E. in 100 ccm.
Adsorptionskurve an Tonerde C in $^{n}/_{1000}$-essigsaurer Lösung.

Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
S.E.	g Al_2O_3	ccm			
0,050	0,00054	5	0,040	89,5	0,28
0,050	0,00036	5	0,031	86,5	3,78
0,050	0,00027	5	0,021	75,9	5,90
0,050	0,00014	5	0,017	81,4	7,66

Tabelle 8.
Präparat C der Tabelle 8 der VIII. Abh. vom S.W. 4,7.
Anfangskonzentrationen 1 S.E. in 50 und in 250 ccm.
Adsorptionskurve an Tonerde C in $^{n}/_{1000}$-essigsaurer Lösung.

Angewandte Mengen		Volumen	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
S.E.	g Al_2O_3	ccm			
0,104	0,00050	5	0,083	164	4,2
0,104	0,00040	5	0,075	186	5,9
0,104	0,00027	5	0,053	196	10,2
0,104	0,00018	5	0,035	196	13,7
0,104	0,00027	25	0,048	178	2,2

Stoffes abweicht. Die beiden Kurven der Abb. 7 und Tab. 7 und Abb. 8 und Tab. 8 stellen die Endprodukte der Reinigung [93] zweier Präparate der VIII. Abhandlung dar. Abb. 7 stammt von dem Präparat D aus gezüchteter Hefe vom Saccharasewert 6,7, Abb. 8 mit den höheren Adsorptionswerten gehört dem Präparat C mit dem niedrigeren Saccharasewert 4,7 an. Aber auch diese einheitlichere Kurve hält dem zweiten Charakteristikum der Reinheit[1], nämlich der Unabhängigkeit von der Anfangskonzentration, nicht stand. Eine in der fünffach verdünnten Lösung aufgenommene Bestimmung fällt deutlich aus der Kurve heraus. Dazu besagen die analytischen Befunde der folgenden Abhandlung, daß beide Präparate noch sehr weit von dem Ziele der Reinigung entfernt sein müssen. Das Erreichen einer Kurve, welche der Adsorptionsisotherme folgt (A.W. = konst. $\times\ c^{\frac{1}{n}}$), ist zwar die notwendige Voraussetzung für das Erreichen des Reinigungszieles, des reinen Enzyms, aber noch kein hinreichender Beweis dafür. Wie schon erwähnt, können auch Assoziationsprodukte der Enzyme, wenn sie fest genug zusammengehalten, die reine Adsorptionsisotherme ergeben. Aber wie weit entfernt wir auch in den Beispielen der Abb. 7 und 8 noch vom reinen Invertin sein mögen, so viel läßt sich aus ihrem Anblick sicher sagen, daß eine weitere Reinigung mit demselben Adsorptionsmittel (Tonerde C) zwecklos ist. Die Fraktionierung des Enzyms durch die aufeinander folgenden Adsorptionen ist so weit fortgeschritten, daß nur noch Stoffe vorhanden sind, die entweder mit dem Invertin in Verbindung stehen, oder aber ein sehr ähnliches Adsorptionsverhalten aufweisen. Daher werden wiederholte Adsorptionen an Tonerde C vielleicht noch

[1] Siehe die 1. Abhandlung über Enzymadsorption, S. 13f.

kleine, sicher aber keine grundsätzlichen Änderungen der Lösungszusammensetzung mehr bringen. Liegt in den Präparaten eine feste Assoziationsverbindung vor, so muß ein neuer Aufschluß in die Reinigungsmaßnahmen eingeschaltet werden. Handelt es sich aber um ein Gemenge adsorptiv ähnlicher Stoffe, so ist zu erwarten, daß wir noch einen Schritt weiter durch den Wechsel im Adsorptionsmittel kommen werden. Die Ähnlichkeit der Stoffe des Gemisches gegenüber dem einen Adsorbens bedingt


[94]

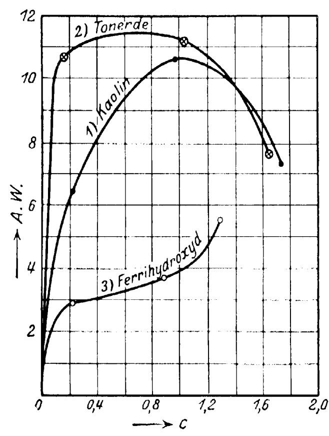


Abb. 9. Die Adsorptionskurven desselben Invertinpräparates an verschiedene Adsorbentien zeigen ganz verschiedenen Verlauf.

Tabelle 9.
Junges, enteiweißtes Neutralautolysat.
Anfangskonzentration 1 S.E. in 500 ccm.
Adsorbiert 1. an Kaolin (in der Abbildung sind die Adsorptionswerte mit 50 multipliziert),
2. an Tonerde C.
3. an Ferrihydroxyd.

	Angewandte Mengen S.E.	g Adsorb.	Volumen ccm	Adsorbierte S.E.	A.W.	c
1.	0,0476	0,202	25	0,0259	0,13	0,32
	0,0476	0,101	25	0,0214	0,21	0,95
	0,0476	0,030	25	0,0044	0,15	1,73
2.	0,0476	0,0040	25	0,0429	10,7	0,19
	0,0476	0,0020	25	0,0222	11,1	1,02
	0,0476	0,0010	25	0,0066	6,6	1,64
3.	0,0476	0,0137	25	0,0397	2,9	0,32
	0,0476	0,0068	25	0,0250	3,7	0,90
	0,0476	0,0027	25	0,0149	5,5	1,31

[95] nämlich keineswegs auch eine Ähnlichkeit im Verhalten gegen andere Adsorbentien.

Von diesem Mittel ist bei der Enzymreinigung häufig Gebrauch gemacht worden. Der Wechsel zwischen Kaolin und Tonerde war bei der Invertinreinigung das beste

Mittel zur Beseitigung des Hefegummis[1]. Beide Adsorbentien fanden erfolgreiche Anwendung bei der Trennung der drei pankreatischen Enzyme Lipase, Trypsin und Amylase[2]. Bei der Reinigung der Lipase sind R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ noch einen Schritt weitergegangen, indem sie als drittes Adsorbens Cholesterin oder Tristearin verwendeten, die, einer ganz anderen Körperklasse entstammend, in ihrer Adsorptionswirkung einen starken Reinigungseffekt erzeugten. Aber selbst bei den sog. polaren Adsorbentien ist es nicht nur die verschiedene Acidität oder Basizität, welche aus der Menge adsorbierbarer Stoffe bald den einen, bald den anderen Gegenpol auswählt, sondern es spiegelt sich im Adsorptionsverhalten die ganze wechselreiche Fülle chemischer Affinitätsbetätigung wieder. Es ist wohl in der Hauptsache die Schwerlöslichkeit der chemischen Verbindung zwischen Adsorbens und Adsorbendum, welches die gute Adsorbierbarkeit eines Stoffes bedingt.

Abb. 9 und Tab. 9 stellen die Adsorption eines enteiweißten Invertinpräparates aus einem raschen Neutralautolysat an die Adsorbentien Kaolin, Tonerde C und Ferrihydroxyd dar. Betrachtet man den gänzlich verschiedenen Verlauf dieser drei Kurven, so erkennt man ohne weiteres die vielfachen Möglichkeiten, welche wir der Fraktionierung dieses Gemisches mit jedem der drei Adsorbentien zugrunde legen können. Ja, selbst zwischen so ähnlichen Stoffen, wie es wasserreichere und wasserärmere Tonerdepräparate sind, bestehen nach den in der ersten Abhandlung über Enzymadsorption [96] wiedergegebenen Kurven[1]) tiefgreifende Unterschiede im Adsorptionsverhalten. Für das Invertin läßt sich die Reihe der Adsorptionsmittel erheblich verlängern: in Stichproben haben sich Zinnsäure, Wolle, Seide, sowie Zellstoff und Baumwolle als wirksam erwiesen. Welchen unter diesen Stoffen wir nach Erschöpfung eines anderen Adsorptionsmittels für die weitere Reinigung auswählen sollen, kann uns die Aufnahme von Adsorptionskurven lehren. Den besten Erfolg wird dasjenige Mittel bringen, dessen Adsorptionskurve sich am deutlichsten von der Adsorptionsisotherme unterscheidet.

---

[1] I. Abhandlung über Invertin, S. 86.

[2] R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ, II. Abhandlung über Pankreasenzyme, Diese Zs. Bd. 125, S. 132 [1923] und R. WILLSTÄTTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. R. F. HESSE, III. Abhandlung über Pankreasenzyme, Diese Ztschr. Bd. 126, S. 143 [1923].

[1]) a. a. O., S. 12, Abb. 5.

Zeitschrift für physiologische Chemie **142**, S. 257 [1925].

53. ZUR KENNTNIS DES INVERTINS.

RICHARD WILLSTÄTTER und KARL SCHNEIDER.

Achte Abhandlung.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 28. Oktober 1924.)

Theoretischer Teil.

Die Anwendung der Adsorptionsmethode zur Reinigung des Invertins hat uns in der ersten Arbeit[1] dieser Reihe zu dem Ergebnis geführt, daß sich das Enzym von den begleitenden Hefeproteinen trennen läßt, und in der fünften Abhandlung[2] zu der Angabe, daß das Invertin auch nicht etwa selbst zu den Eiweißkörpern zählt. Mit dieser Erklärung stehen die Anschauungen über die Natur des Invertins im Gegensatz, die vor kurzem H. v. EULER und K. JOSEPHSON[3] entwickelt haben. Schon mehrere Male haben die Annahmen von H. v. EULER und seinen Mitarbeitern über die Zusammensetzung des Invertins, über die Bedeutung des Phosphorgehaltes, über die Proportionalität des Stickstoffgehaltes mit der enzymatischen Wirkung, über die Proteinähnlichkeit des Invertins der Forschung durch präzise Fragestellung wichtige Anregungen geboten. So erwerben sich unsere Stockholmer Kollegen mit ihrer neuen **[258]** Theorie wieder das Verdienst, befruchtend auf die Untersuchung der stofflichen Natur der Enzyme zu wirken.

Während H. v. EULER und K. JOSEPHSON anerkennen, daß es gelinge, das Invertin von beigemengten Eiweißstoffen zu trennen, finden sie im Stickstoff- und im Schwefelgehalt und in der Konstitution der Bausteine des Enzyms eine so große Übereinstimmung mit den Eiweißkörpern, daß sie die Saccharase als eine proteinähnliche Substanz erklären[1]) und einen nahen Zusammenhang der spezifischen Enzymwirkung mit den amphoteren Eigenschaften des Enzymproteins annehmen[2]). Aus dem Ver-

[1] Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21].
[2] Diese Zs. Bd. 133, S. 193 [1923/24].
[3] Chem. Ber. Bd. 56, S. 446 u. 1097 [1923]; Bd. 57, S. 299 u. 859 [1924] und diese Zs. Bd. 138, S. 11 u. 38 [1924].
[1]) Chem. Ber. Bd. 57, S. 299 [1924], und zwar S. 300ff. [2]) Ebenda.

halten des Invertins gegen Trypsin, von dem es schwer angegriffen, und wenn es angegriffen wird, nicht ohne Verlust seiner Aktivität[3], schließen H. v. EULER und K. JOSEPHSON[4] in folgender Weise auf die „Eiweißnatur" des Enzyms: „Die Aktivität der Saccharase (oder die aktive Gruppe derselben) hängt mit dieser von uns als ‚Proteinteil' genannten Komponente der Saccharase aufs engste zusammen." Nach dieser Auffassung soll es die als „Proteinteil bezeichnete Komponente der Saccharasepräparate" sein, „welche den schließlichen Zerfall des Substrates — Saccharose bzw. Raffinose — bewirkt[5]."

Über den Tryptophangehalt der Saccharase.

Die neuen Untersuchungen über die Bausteine ihrer Saccharase, über die ganz spezifische Bauart des „Enzymeiweiß"[6], haben H. v. EULER und K. JOSEPHSON mit sehr bemerkenswerten und genauen Mitteilungen über den auffallend hohen Tryptophangehalt der Saccharase begonnen[7]. In ihren besten Saccharasepräparaten fanden diese Forscher eine große [259] Anreicherung des Tryptophans.. Fünf Präparate von der enzymatischen Wirksamkeit entsprechend If = 225 bis 245 (d. i. Zeitwert 0,27 bis 0,24) enthielten 4,93 bis 5,58% Tryptophan, d. i. mehr als das Doppelte vom Tryptophangehalt der Hefeproteine.

Vergleichen wir mit diesen analytischen Angaben die Zusammensetzung jener Invertinpräparate, von denen R. WILLSTÄTTER und F. RACKE mitteilen[1]): „Nach der zweiten Adsorption bleiben die Eiweißreaktionen ganz aus." Ein typisches Präparat jener Arbeit, dessen Zeitwert indessen infolge der Inaktivierung im Laufe der Reinigungsvornahmen ungünstig geworden (S.W. 0,189), aber ohne die Aktivitätsverluste etwa 0,7 betragen hätte, wird nach der O. v. Fürthschen Bestimmungsweise geprüft. Es enthält gar kein Tryptophan. Ein anderes Präparat, ebenfalls aus gealtertem saurem Hefeautolysat, aber in der heute üblichen Weise durch Adsorption bei großer Verdünnung mit Kaolin und Tonerde gereinigt (Zeitwert 0,37; If = 164), enthält dagegen ziemlich viel Tryptophan (3,7%). Wenn man nun aber ein solches Invertin einer weiteren (zweimaligen) Reinigung mit Bleiacetat unterwirft, wobei sein Saccharasewert auf 4,35 (Zeitwert 0,23; If = 265) ansteigt, so verliert es seinen Gehalt an Tryptophan vollständig.

Jene Präparate aus gealterten Autolysaten verloren ungemein schwer oder auch gar nicht ihren Gehalt an Tyrosinpeptid, wie die besonders hartnäckige Millonreaktion erwies. Hingegen liefern uns frische Autolysate, besonders die bei neutraler Reaktion gewonnenen, so leicht Invertinpräparate, welche die Millonreaktion nicht geben, also

[3] Diese Erscheinung dürfte so zu erklären sein, daß das peptidhaltige Invertinpräparat durch den tryptischen Abbau seiner Schutzstoffe beraubt und der Zersetzung preisgegeben wird.
[4] Diese Zs. Bd. 138, S. 38 [1924], und zwar S. 46.
[5] Chem. Ber. Bd. 57, S. 859 [1924].
[6] Diese Zs. Bd. 138, S. 38 [1924], und zwar S. 48.
[7] Chem. Ber. Bd. 57, S. 859 [1924].
[1]) Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 102.

keine Spur von Tyrosin enthalten. Deshalb sind wir daran gegangen, Invertin in so reinem Zustand, als es nach der Adsorptionsmethode zur Zeit erzielt werden kann, aus frischen und möglichst rasch gewonnenen Hefeautolysaten zu isolieren, die sich für unsere bisherigen Verfahren nicht recht eigneten.

Die frischen Neutralautolysate enthalten viel Hefeeiweiß in ursprünglichem oder wenig verändertem Zustand. Es läßt sich leicht ausfällen und das Invertin in der Mutterlauge durch [260] Fällung mit Alkohol unter bestimmten Bedingungen, am besten unter gleichzeitiger Adsorption an Calciumphosphat, auch von Eiweißspaltungsprodukten weitgehend befreien. Dann wird das noch stark hefegummihaltige Präparat durch einmalige oder wiederholte Adsorption an Kaolin gereinigt. Es ist so arm an schützend wirkenden Begleitstoffen, daß Inaktivierung am Kaolin nicht vermieden werden kann. Das inaktivierte Enzym begleitet bei der Anwendung von Kaolin das aktive. Daher erreichen wir nur einen Saccharasewert 1,1 bei einmaliger, den viel ungünstigeren 0,21 bei zweimaliger Reinigung. Ohne Aktivitätsverlust wären, wie sich mit genügender Sicherheit schätzen läßt, die Zeitwerte 0,5 und 0,25 erreicht worden (also If 122 und 243). Diese Invertinpräparate enthalten nach der einmaligen Kaolinbehandlung 0,5% oder ein wenig mehr Tryptophan, nach der wiederholten Kaolinadsorption gar kein Tryptophan.

Es ist ein großer Fortschritt gegenüber den früheren Arbeiten, daß die vielen Erfahrungen über die Adsorption und Elution heute auch Beobachtungen und Schlußfolgerungen ermöglichen mit den Enzympräparaten, die mehr oder weniger inaktiviert worden sind. Anfangs waren Präparate, die beim Reinigen keinen günstigen Zeitwert erreichten, wertlos. Es fehlte an Anhaltspunkten, wie weit Mängel in der Versuchsausführung, wie weit Zersetzungen an ungünstigen Aktivitätswerten Schuld trugen. Seitdem ist es aber möglich geworden, mit großer Vorsicht auch Präparate zu vergleichenden Zwecken heranzuziehen, die in genau kontrolliertem Reinigungsgang Abnahme der enzymatischen Wirksamkeit erlitten haben. Freilich wird man auch künftig die entscheidenden Schlußfolgerungen nur aus Beobachtungen an Präparaten herleiten, deren enzymatische Konzentration durch hohe Aktivität verbürgt ist.

Die Zersetzlichkeit, die dem Invertin aus frischen Neutralautolysaten nach der Eiweißabtrennung eigen ist, gab Veranlassung, bei den ersten Reinigungsoperationen, also noch in das Kaolinadsorbat, das Hefeeiweiß mitzuführen und es erst nach dem Eluieren aus dem Kaolin mit Säure abzuscheiden. Dieser einzige, scheinbar geringfügige Umstand war von [261] entscheidendem Einfluß auf die Zusammensetzung der Invertinpräparate, auf die Assoziation der Saccharase mit Peptiden. Trotz der raschesten Ausführung der Operationen ist das Protein von der begleitenden Hefeprotease angegriffen und das Tryptophanpeptid (früher als das Tyrosinpeptid) reichlich gebildet worden, so daß es sich dem Invertin beigesellt und es in günstiger Weise vor Inaktivierung schützt. In diesem Gang der Isolierung hält nach der Eiweißfällung das Invertin bei Zeitwerten von 1,0 bis 0,56 (If 61 bis 108) und ist in geeignetem Zustand für die Anwendung der Tonerdeadsorption.

Die Adsorptionsmethode,

die schon eine alte ist, wurde an der Aufgabe der Isolierung von Enzymen in den letzten Jahren zu größerer Leistungsfähigkeit entwickelt, welche die Methode auch für die Serumforschung, für die Darstellung von Hormonen und anderen physiologisch aktiven Stoffen empfiehlt. In der ersten Arbeit dieser Reihe gewann das Verfahren präparative Brauchbarkeit durch Anwendung eines guten Ausgangsmaterials von Hefeautolysat und Bereitung geeigneter Sorten von Aluminiumhydroxyd. Seitdem ist aber eine für die Isolierung der Saccharase oder eines andern Enzyms wichtige Leistung, die mit dem Adsorptionswert, der Zahl der von 1 g Al_2O_3 aufgenommenen Enzymeinheiten, gemessen wird, bedeutend gesteigert worden, für Invertin auf mehr als das Tausendfache des Wertes, den R. WILLSTÄTTER und F. RACKE in ihren Hefeautolysaten beobachteten. Die Fortschritte beruhen, abgesehen von der Vervollkommnung der Invertinfreilegung bei der Hefeautolyse und der Verbesserung der Autolysate durch Alterung, auf der Bestimmung der für die Adsorption jeweils geeigneten Verdünnung und der optimalen Acidität, und sie bestehen ferner in fraktionierender und wiederholter Anwendung des Adsorbens. Ein leitender Gedanke in der vorliegenden Untersuchung war es, die Adsorptionsmethode für Invertin dadurch zu vervollkommnen, daß wir das präparative Verfahren in engem Zusammenhang mit der vor kurzem veröffentlichten[1] und mit [262] der voranstehenden Untersuchung von H. KRAUT und E. WENZEL „Über Enzymadsorption" ausführten. Die Adsorptionsmethode ist nämlich so geleitet worden, daß sich das Verhalten des Enyzms gemäß den nach H. FREUNDLICH[1]) ermittelten Adsorptionskurven mehr und mehr dem Adsorptionsverhalten eines reinen Stoffes genähert hat. Dabei ist der Adsorptionswert des Aluminiumhydroxyds C für Saccharase bis auf 210 gestiegen. Während in den ersten Versuchen von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE 1 g Al_2O_3 die Invertinmenge aus 10 g lebender Hefe aufnahm, hat in unseren letzten Versuchen 1 g Al_2O_3 (A.W. 200, Präparat vom S.W. 5) das Invertin von 12000 bis 14000 g lebender Hefe vom Zeitwert 300 bis 330 oder von 3 bis $3^1/_2$ kg Trockenhefe adsorbiert. Wenn unser bestes Saccharasepräparat (Zeitwert 0,15; S.W. 6,67; If 406) von Tonerde mit dem Adsorptionswert 200 aufgenommen wird, so hat das von 1 g Al_2O_3 gebildete Adsorbat das Gewicht von $2^1/_2$ g. Im Adsorbat ist ungefähr dieselbe Konzentration erreicht wie vor kurzem in den besten Invertinpräparaten (Zeitwert 0,25; S.W. 4). Das Tonerdeadsorbat ist also im Invertingehalt 1200fach konzentrierter als unsere Trockenhefe und das Invertinpräparat von derzeit höchstem Reinheitsgrad (1 S.E. in 7,5 mg Präparat) ist 2000fach konzentrierter als die Trockenhefe vom üblichen Zeitwert 300.

Die systematische Anwendung der Tonerdeadsorption auf die frischen Neutralautolysate (nach Kaolinadsorption und darauffolgender Eiweißfällung) hat bei den zahlreichen Wiederholungen des Verfahrens bis zur Grenze seines Leistungsvermögens unter den heute bekannten Bedingungen zu dem Ende geführt, das sich das Invertin

[1] VI. Abh. dieser Reihe. Diese Zs. Bd. 133, S. 1 [1923/24] (*Abh. 51*).

[1]) Kapillarchemie, III. Aufl., Leipzig [1923], S. 232ff.

wie eine einheitliche Substanz verhält, wenn es, ohne erheblichen Aktivitätsverlust zu erleiden, den Saccharasewert 5 erreicht hat. Das ist ein überraschendes Resultat. Es ist enttäuschend, daß die Adsorption mit so außerordentlichen Adsorptionswerten nicht zu einer größeren Steigerung der enzymatischen Konzentration geführt hat. Aber dies wird durch das Ergebnis der Analyse erklärt. Die besten [263] Präparate aus diesem Verfahren (Abschn. I d. exp. Teils) enthalten 9% Tryptophan. Aus frischen Autolysaten und aus gealterten, aus Neutralautolysaten und aus sauren ist also tryptophanreiches wie tryptophanfreies Invertin erhalten worden.

	Tryptophangehalt (%)
Invertin aus frischem Autolysat nach Verf. Abschn. I, S.W. 6,67; N-Geh. 9,21	8,9
Invertin aus frischem Autolysat nach Verf. Abschn. II, S.W. 0,21 (infolge Inaktiv., geschätzt 4); N-Geh. 6,55	0
Invertin aus gealt. Autolysat nach Verf. Abschn. III C, S.W. 3,57; N-Geh. 8,10	9,2
Invertin aus gealt. Autolysat nach Verf. Abschn. III E, S.W. 4,16; N-Geh. 4,80	0

Wie die Gehalte an spezifischen Eiweißbausteinen, so unterliegen die Stickstoffgehalte der Enzympräparate so großen Schwankungen, daß die von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] angenommene Proportionalität von enzymatischer Wirkung und Stickstoffgehalt nicht bestätigt werden kann. In den Beispielen obenstehender Tabelle bewegt sich der Stickstoffgehalt zwischen 4,80 und 9,21 und der Quotient $\frac{\text{If}}{\text{Proz. Stickstoff}}$ zwischen 28 und 53. Ebensowenig wird sich die Proportionalität zwischen Saccharasewirkung und Schwefelgehalt aufrechthalten lassen.

Auf die Präparate der zuletzt beschriebenen Art hat sich, da sie sich durch Beständigkeit an der Tonerde auszeichnen, die Adsorptionsmethode am besten in systematischer Weise anwenden lassen. Wenn diese Anwendung nicht zu einer höheren Steigerung der Enzymkonzentration geführt hat, so trägt daran die Vergesellschaftung des Enzyms mit einem wahrscheinlich großen tryptophanhaltigen Peptidkomplex schuld.

Die mit unseren Präparaten beobachteten Adsorptionskurven sind in Wirklichkeit nicht diejenigen des Invertins selbst, sondern sie sind durch das Adsorptionsverhalten eines invertinführenden Begleitstoffes oder adsorptiv verbundenen Gemisches von Begleitstoffen bedingt. Die Adsorption hat in [264] diesem Falle das Invertin nicht aus den Aggregaten abzutrennen vermocht, worin es mit einem Koadsorbens oder mit mehreren Koadsorbentien adsorptiv verbunden ist. Daraus ergibt sich die Aufgabe, die Adsorptionsmethode nach geänderten Richtlinien weiter zu entwickeln. Es wird dann wohl gelingen, die Aggregate aufzulösen, die jetzt unzerlegbar waren; aber dem Erfolge sind Schranken gesetzt durch die verminderte Beständigkeit, die dem Enzym gemäß vielen Beobachtungen nach der Abtrennung der seine Aktivität schützenden Begleitstoffe eigen ist. Die präparative Arbeit ist dem Ziele nahe, das heute für sie erreichbar ist.

---

[1] Chem. Ber. Bd. 56, S. 446 u. 1097 [1923]. — K. JOSEPHSON, Diese Zs. Bd. 136, S. 224 [1924]. Siehe dazu unsere V. Abhandl. und Abschn. IV dieser Abhandlung.

Über die Zusammensetzung der Invertinpräparate.

Der Vergleich der nach verschiedenen Verfahren dargestellten Invertinpräparate lehrt, daß die Saccharase ihre Gesellschaft mit Begleitstoffen wechselt und daß diesen keine spezifische Bedeutung zukommt. Wenn das Hefeeiweiß der Proteolyse unterliegt, was schon bei der Invertinfreilegung nur teilweise vermieden werden kann, so entsteht u. a. bald tryptophanhaltiges Peptid. Dieses hat die Fähigkeit, sich mit dem Enzym zu vergesellschaften und, wenn seine Menge ausreicht, ein Aggregat zu bilden, das sehr leicht als Ganzes adsorbierbar ist. Wenn die Proteolyse im Autolysat fortschreitet, so wächst allmählich die Menge von Spaltungsprodukt, das die Millonreaktion gibt, also von Tyrosinpeptid. Auch dieses bildet mit dem Invertin Aggregate und zwar so, daß aus dem Gemisch von invertinhaltigem Tryptophanpeptid und Tyrosinpeptid das erstere weggeschafft werden konnte, während das Invertin in hoher Ausbeute mit dem Träger der Millonreaktion verknüpft blieb. Es gibt deutliche Anzeichen, daß diese beiden Peptide nicht die einzigen sind, die unter solchen Bedingungen mit dem Invertin assoziiert auftreten und ihm als Koadsorbentien und Schutzstoffe anhaften. Sowohl durch Fällungsmittel (Bleiacetat) wie unter Umständen durch Adsorption ist es möglich, die Saccharase von diesen eng mit ihr zusammenhängenden Fremdstoffen zu trennen.

Die Untersuchung ergibt also, daß bei den Abweichungen zwischen den Invertinpräparaten zweier Laboratorien nicht [265] Unterschiede der verarbeiteten Hefen im Spiele sind. Der Arbeiter hat es in der Hand, aus derselben Hefe, aus demselben Autolysat Invertinpräparate mit sehr verschiedenen Aggregaten der Saccharase darzustellen. Die Kunst der Arbeit wird es sein, das Minimum von Schutzstoffen aufzusuchen, womit die Saccharase bei unverminderter Aktivität gehalten werden kann.

Diese Erkenntnis gilt nicht für das Invertin allein. Die Versuche der präparativen Reinigung der Pankreaslipase, der Pankreasamylase, der pflanzlichen Peroxydase lehren dasselbe. In der ersten Arbeit über Peroxydase[1] bestanden die Enzympräparate von ansehnlichem Reinheitsgrad in der Hauptsache aus glucosidischer Substanz mit einem Eisengehalt, welcher der Wirksamkeit proportional anstieg. Die folgenden Schritte der Reinigung[2] bis auf das Fünffache der höchsten in Abhandlung I erreichten Konzentration (das 12000fache der getrockneten Pflanzenwurzel) waren entscheidend. Bei dieser Steigerung der Konzentration sank der Eisengehalt auf $^1/_7$ des zuvor gefundenen (0,06%) und die kohlehydrathaltige Substanz ward vollständig abgetrennt.

Die präparativen und analytischen Arbeiten über Peroxydase, Invertin und Lipase haben Erkenntnisse gezeitigt von den Einflüssen der Begleitstoffe auf die Eigenschaften eines Enzyms und von seiner Unbeständigkeit in höheren Reinheitsgraden. Die meisten Enzymmerkmale werden von den begleitenden Fremdstoffen beeinflußt. Zuerst wurde der Einfluß auf das Adsorptionsverhalten erkannt, hier

[1] R. Willstätter und A. Stoll, Ann. d. Chem. Bd. 416, S. 21 [1917/18].
[2] R. Willstätter und A. Pollinger, Ann. d. Chem. Bd. 430, S. 269 [1922/23].

wird ein solcher bezüglich der charakteristischen chemischen Proben nachgewiesen, vor kurzem ein Einfluß in bezug auf die p_H-Abhängigkeit eines Enzyms[3]. Dazu kommen die Einflüsse der begleitenden Stoffe auf das Verhalten gegen Aktivatoren, Hemmungskörper und Gifte, auf das [266] Temperaturoptimum und die Zerstörungstemperatur der Enzyme. Nur von der Konfigurationsspezifität, d. h. von der Spezifität der Enzyme gegenüber asymmetrisch konstituierten Substraten ist es bis jetzt noch nicht gefunden worden, daß sie von abtrennbaren Begleitern bedingt oder beeinflußt sein kann. Zu den Einflüssen der Begleitstoffe, die ohne spezifische Bedeutung für die eigentliche Enzymwirkung sind, gehört auch die Erhöhung der Beständigkeit[1]). Die Abtrennung der mit einem Enzym adsorptiv zusammenhängenden Fremdkörper hat einen Beständigkeitssturz oder -verlust zur Folge, sei es in Lösungen oder an der Oberfläche anorganischer Adsorbentien.

Die Enzymuntersuchungen unseres Laboratoriums sind mit der Frage[2]) begonnen worden, ob den enzymatischen Wirkungen nur eigentümliche Dispersitätsverhältnisse beliebiger Stoffe zugrunde liegen oder chemische Verbindungen von besonderer Konstitution. Die Dispersitätsänderungen, die dem Enzym bei dem Übergang vom Pilz in das Autolysat und in die Adsorbate und in die reineren Lösungen zugemutet werden, sprechen gegen die Annahme, daß die Dispersitätsverhältnisse das Wesentliche seien. Den enzymatischen Wirkungen werden daher Stoffe von chemischer Eigenart zugrunde liegen. Aber ihre chemische Konstitution ist infolge der Unbeständigkeit verschleiert, die von der Reaktionsfähigkeit der aktiven Gruppen bedingt zu sein scheint.

Experimenteller Teil.

I. Verarbeitung frischer Neutralautolysate unter Mitführung und nachfolgender Ausfällung von Eiweiß.

(Tryptophanreiches Invertin.)

A. Rasche Autolyse bei neutraler Reaktion.

Für die Gewinnung der Invertinlösungen war bis vor einigen Jahren die sehr lang dauernde und vollständige Autolyse [267] der Hefe nach C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON[1]] das gebräuchliche Verfahren; dem Enzym war die größtmögliche Menge von Begleitstoffen beigemischt. Diese Methode ist durch einige Verfahren der beschleunigten Invertinfreilegung ersetzt worden, die sich hinsichtlich der Acidität der entstehenden Autolysate von einander unterschieden. Entweder erfolgte die Autolyse bei der spontan auftretenden sauren Reaktion (p_H = 5,5 bis 4,5) oder unter Neu-

[3] R. WILLSTÄTTER, F. HAUROWITZ und F. MEMMEN, Diese Zs. Bd. 140, S. 203 [1924].

[1]) Beständigkeitszunahme eines Enzyms während der Reinigung wird sich dann ergeben, wenn durch diese z. B. eine begleitende Protease abgetrennt wird, welche auf die mit dem Enzym assoziierten Peptide abbauend einwirkt.

[2]) R. WILLSTÄTTER, Chem. Ber. Bd. 55, S. 3601 [1922].

[1]] Jl. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834 [1890].

tralisation mit Ammoniak, Ammonphosphat u. dgl. Ein solches Verfahren der raschen Autolyse (ohne Neutralisation) wurde zuerst von C. S. HUDSON[2] angewandt; es war aber in den europäischen Laboratorien unbekannt geblieben.

Die ohne Neutralisation gewonnenen Autolysate enthalten nicht mehr genuines Hefeeiweiß, da dieses bei der beträchtlich sauren Reaktion schon vor der Abtrennung der Heferückstände aus der Lösung ausfällt. Dennoch ist der Gehalt an Inhaltsstoffen der Hefe und ihren Abbaustoffen groß; die Freilegung des Invertins erfolgt unter den Bedingungen dieser Autolyse bei saurer Reaktion wenig auswählend, weniger als bei den Neutralautolysaten. Die letzteren weisen trotz ihres großen Gehaltes an nativem Eiweiß das Invertin in günstigerer enzymatischer Konzentration auf.

Die verschiedenen Autolysate unterliegen bei längerem Aufbewahren gewissen Veränderungen, enzymatischen Hydrolysen, die namentlich die Proteine betreffen, wenn auch in den sauren Lösungen nicht die günstigsten Bedingungen für das Hefetrypsin gegeben sind. Den größten Einfluß auf die Isolierung des Invertins gewannen unsere Beobachtungen über dieses Altern[3] der Autolysate, da durch die langsam verlaufenden Abbauvorgänge die Trennung des Enzyms von der Hauptmenge seiner Begleitstoffe wesentlich erleichtert wird. Die Adsorptionsmethoden mit Tonerde und Kaolin (I. und IV. Abh.) und die Reinigung mit Hilfe der Bleifällung (III. Abh.) **[268]** sind an gealterten Autolysaten durchgeführt worden. Die Methoden für die Abtrennung der Fremdstoffe, besonders des Hefegummis, ließen sich nicht einfach von den gealterten Autolysaten auf frische übertragen. Die Fortschritte unserer früheren Arbeitsweisen werden aufs Spiel gesetzt, sobald andersartige Ausgangslösungen zur Verarbeitung kommen. Durch Adsorption mit Kaolin kann man Invertin von Hefegummi dann leicht abtrennen, wenn das Enzym mit den für die Millonreaktion verantwortlichen Begleitstoffen assoziiert ist; fehlen dagegen diese, so scheint das Invertin hartnäckiger mit dem Hefegummi vergesellschaftet zu sein und dieser wird durch das Kaolinverfahren auch bei Wiederholungen schwieriger und weniger vollständig abgetrennt.

Die Invertinpräparate unserer I., IV. und V. Arbeit sind durch Adsorptionsverfahren im allgemeinen aus den bei saurer Reaktion gewonnenen (dann gealterten) Autolysaten hervorgegangen; nur für die mittels der fraktionierten Bleifällung gereinigten Präparate der III. Abh. waren (gealterte) Neutralautolysate vorzuziehen. Nun hat die Prüfung des Invertins auf die Eiweißreaktionen, namentlich auf die Millonprobe, neuerdings zu einer Änderung der Methode Anlaß gegeben. Es hat sich in der V. Abh. ergeben, daß Präparate aus frischen Autolysaten, gewonnen bei saurer Reaktion, die schwächste Millonreaktion zeigen; in der Fortsetzung jener Untersuchung hat es sich erwiesen, daß andererseits Invertin aus Neutralautolysaten, wenn auch gealtert, viel schwächere Millonreaktion zeigt, als Invertin

[2] C. S. HUDSON und H. S. PAINE, Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 32, S. 774 [1910]; C. S. HUDSON, Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 36, S. 1566 [1914].

[3] Vgl. III. und IV. Abh.

aus den bei saurer Reaktion gewonnenen Autolysaten. Deshalb sind wir dazu übergegangen, Autolysate bei genau neutraler Reaktion (die früheren Neutralautolysate waren immerhin gegen Ende der Darstellung etwas sauer geworden[1]) und möglichst schnell zu gewinnen. Dadurch soll vermieden werden, daß im Laufe der Verarbeitung das Invertin sich mit den für die Millonreaktion verantwortlichen Eiweißabbauprodukten vergesellschaftet. Das Hefeeiweiß bleibt unter diesen Umständen in annähernd nativem Zustand im Autolysat und läßt sich bei raschem Arbeiten leicht und fast vollständig [269] ausfällen. Zu diesem hauptsächlichen Vorteil gesellt sich ein weiterer: man kann durch geeignete Wahl des Zellgiftes, am besten durch Hefeverflüssigung mit Chloroform, die Autolyse so leiten, daß verhältnismäßig wenig Hefegummi in die Lösung mit übergeht. Im folgenden werden solche Neutralschnellautolysate, die für unsere früheren Methoden nicht geeignet waren, auf zwei Weisen in frischem Zustand verarbeitet. Entweder so, daß die Eiweißstoffe zu allem Anfang ausgefällt werden, wie es schon J. MEISENHEIMER, ST. GAMBARJAN und L. SEMPER[1]) bei der Verarbeitung von Hefepreßsäften[2]) gemacht haben (Abschn. II). Dies hat den Nachteil, daß das Invertin danach wenig geschützt und schon bei der Adsorption wenig beständig ist. Aus diesem Grunde ist eine zweite Arbeitsweise in den Vordergrund getreten und soll hier zunächst behandelt werden. Eine Vorreinigung durch Alkohol wird zunächst vorgenommen, dann die Adsorption mittels Kaolin und erst danach die Beseitigung des leicht fällbaren, also noch wenig veränderten Proteins.

Die Neutralautolyse wurde in der I. Abh. (S. 54) so ausgeführt, daß man die frische Hefe nach Eintragen in das gleiche oder doppelte Volumen Wasser z. B. mit Toluol + Essigester (50 ccm für 1 kg) verflüssigte und bald begann, die auftretende Säure mit verdünntem Ammoniak abzustumpfen. Die Neutralisation wurde in den ersten Stunden oft und weiterhin am ersten Tage noch einige Male vervollständigt; die Auflösung des Invertins erforderte 3 bis 4 Tage. Dieses Verfahren ist für die Gewinnung der säureempfindlichen Hefemaltase ausgestaltet worden[3]) derart, daß man in den ersten Stunden der Autolyse ständig an der Einstellung der neutralen Reaktion arbeitete.

Die Autolyse mit Chloroform führt nach den quantitativen Bestimmungen von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE (Abh. I, S. 52) [270] zu hefegummiärmeren Invertinlösungen als die Anwendung anderer Zellgifte. Ergänzend wurde nun untersucht, wie sich die verschieden bereiteten Autolysate nach der Vorreinigung durch Alkoholfällung, Adsorption an Kaolin ($^n/_2$-essigsaure Lösung, 1 E. in 2 l) und Elution hinsichtlich des Gehaltes an Hefegummi verhalten. Die Autolyse mit Toluol führte,

[1] Vgl. III. Abh. Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 8.

[1]) Biochem. Zs. Bd. 54, S. 108 [1913].

[2]) E. BUCHNER, H. BUCHNER und M. HAHN, Die Zymasegärung, München [1903], und zwar E. BUCHNER, S. 21.

[3]) R. WILLSTÄTTER, G. OPPENHEIMER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 110, S. 232 [1920], und zwar S. 237; R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 199 [1921], und zwar S. 209.

wie die Tab. 1 zeigt, zu Invertin mit großem, die mit Chloroform zu Präparaten von geringfügigem Hefegummigehalt. Daher ist in allen folgenden Versuchen Chloroform angewendet worden.

Tabelle 1.
Einfluß der Zellgifte auf den Hefegummigehalt von gereinigtem Invertin.

Nr.	S.W. Hefe	Zellgift; Menge für 1 kg Hefe	Dauer der Autolyse Std.	Ausbeute, Proz. des Hefeinvertins	S.-W. Autolys.	Hefegummireaktion nach der Reinigung (gepr. m. 0,25 S.E.)
1	0,00395	150 ccm Toluol	7	35		
			20	87	0,00689	
			31	109	0,00877	sehr stark
2	0,00341	150 ccm Toluol	6,5	63		
			19	113	0,00666	„ „
3	0,00341	mit 150 ccm Toluol verfl.; 66 ccm Chloroform zugesetzt	8	76		
			14	92		
			25,5	100	0,00628	mittelstark
4	0,00341	mit 66 ccm Chloroform verfl.; dann 150 ccm Toluol zugesetzt	7,5	73		
			21	94	0,00671	„
5	0,00395	150 ccm Chloroform	3	25		
			24	73	0,00887	
			48	85	0,0100	schwach
6	0,00341	66 ccm Chloroform	8,5	43		
			22	71		
			33	74	0,00775	gering
7	0,00689	75 ccm Chloroform	20	46		
			40	86		
			48	94	0,0161	„
			88	97		

[271] Die Dauer der neutralen Autolyse nach Chloroformverflüssigung war nach den Versuchen der Tab. 2 von der Menge des Zellgiftes, wenn sie nur ausreichte, unabhängig; sie betrug auch bei großen Chargen einen bis zwei Tage, während das gewöhnliche Autolysenverfahren bei saurer Reaktion mit unserer Brauereihefe vier bis sieben Tage beanspruchte. Dem in der I. Abh. beobachteten Enzymzuwachs sind wir hier auch mehrmals begegnet. Es kamen Ausbeuten von 114 und 136% freigelegten Invertins vor, während in häufigeren Fällen die Ausbeute mit der in der angewandten Hefe bestimmten Invertinmenge annähernd übereinstimmte.

Tabelle 2. Verlauf der Neutralautolyse mit Chloroform.

Nr.	S.W. Hefe	Chloroformmenge für 1 kg ccm	Dauer der Autolyse Std.	Ausbeute, Proz. des Hefeinvertins	S.W. Autolysat
1	0,00380	600	7,5	64	
			31	71	
			48	93	0,00871
2	0,00380	150	3	25	
			24	73	
			48	85	0,0100

Tabelle 2. (Fortsetzung.)

Nr.	S.W. Hefe	Chloroformmenge für 1 kg ccm	Dauer der Autolyse Std.	Ausbeute, Proz. des Hefeinvertins	S.W. Autolysat
3	0,00380	75	18	49	
			26	67	
			40	89	0,0101
4	0,00329	75	17	58	
			25	64	
			41	97	
			72	97	0,00841
5	0,00317	70	8	43	
			20	83	
			23	90	0,0116
6	0,00380	66	8	88	
			24	114	
			48	136	0,00813
7	0,00270	60	17	68	
			24	89	
			38	110	0,00795

[272] Die angewandten Bierhefen waren im Invertingehalt, wie die folgenden Beispiele lehren, durchschnittlich weniger günstig als in den Vorjahren.

Zeitwerte der Löwenbräuhefe.

(Trockengewicht durchschnittlich 25 %.)

Mai	1923	314,	317		
Juni	1923	284,	290,	236	
Oktober	1923	340,	390		
November	1923	293,	293,	263	
Dezember	1923	370,	340		
Januar	1924	304,	268,	448	
Februar	1924	370,	348,	442,	316
Juni	1924	360,	370,	348	
Juli	1924	332,	315		

Darum begannen wir von den schönen Methoden Gebrauch zu machen, die H. v. Euler[1] und seine Mitarbeiter sowie J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper[2] einführten, um die Hefe durch geeignete Führung invertinreicher zu machen. In den großen Hefechargen stieg, wenn wir sie einige Tage in 2proz. Zuckerlösung unter Zusatz von Nährsalzen und unter Bewegung mit Luft auf 30° C hielten, der Invertingehalt vom Zeitwert 360 auf 145, von 315 auf 130 und 116, von 332 auf 127 an.

Beispiel der Autolyse:

12 kg frische Hefe (170 S.E.) verarbeiteten wir in 2 Chargen. Je 6 kg wurden in einem Steinzeugtopf mit 360 ccm Chloroform mittels starker Holzstäbe innig ver-

[1] H. v. Euler und O. Svanberg, Diese Zs. Bd. 107, S. 269 [1919], und zwar S. 286; Bd. 109, S. 65 [1920], und zwar S. 66 u. ff. H. v. Euler und B. af Ugglas, Diese Zs. Bd. 70, S. 279 [1910].

[2] Biochem. Zs. Bd. 54, S. 122 [1913].

mischt und geknetet. Schon nach 5 Minuten wurde bei ununterbrochener Bearbeitung die Hefemasse breiig und in weiteren 5 Minuten bei fortdauerndem Rühren flüssig. Nach 10 bis 20 Minuten war die Verflüssigung weit fortgeschritten; man versetzte die Hefe mit dem gleichen Gewicht Wasser und neutralisierte sie unter ständigem Rühren mit verdünntem [273] Ammoniak. Die ausgeschiedene Säure war hauptsächlich Phosphorsäure. Dann ließen wir unter steter Bewegung der Flüssigkeit mit einem Rührwerk die Autolyse bei Zimmertemperatur weitergehen und stellten in kurzen Zwischenräumen durch Neutralisieren auf Lackmus p_H 6,5 bis 7 ein. Die produzierten Säuremengen differierten bei den einzelnen Hefeproben, wie die folgenden Beobachtungen über den Ammoniakverbrauch in 2 Fällen zeigen. Nach 6 bis 8 Stunden war die Säurebildung entweder beendet oder sehr verlangsamt.

I.	13	20	35	50	70	90	120	170	240	300	360	Minuten nach Beginn der Autolyse
	14,5	7,6	4,5	3,1	2,3	1,8	1	1	0,6	0	0	ccm 10proz. Ammoniak für 1 kg Hefe

II.	15	25	40	85	110	140	170	260	420	von 500 bis 1200	Minuten nach Beginn der Autolyse
	12,2	2,2	2	2,2	2	1,5	1,2	1,1	1,1	2,3	ccm 10proz. Ammoniak für 1 kg Hefe

Die Autolyse durfte nur so lange fortgeführt werden, wie es die Freilegung des Invertins erforderte, gewöhnlich 48 Stunden. Nach beispielsweise 8, 24 und 30 bis 48 Stunden wurden Proben von 20 ccm herausgenommen, durch Zentrifugieren und Filtrieren auf gehärtetem Papier von Zellen befreit und zur Bestimmung (mit 5 bzw. dann 2 und schließlich 1 ccm) der Vergleichszeitwerte verwendet, um die Ausbeute in Prozenten vom Invertingehalt der Hefe zu ermitteln (vgl. Tab. 2).

Das Autolysat trennten wir schließlich in einer großen Zentrifuge von den Heferückständen ab und klärten die Flüssigkeit vollends durch schnelles Filtrieren unter Zusatz von etwas Kieselgur auf einer Reihe großer Filter. Die praktische Ausbeute betrug in unserem Falle 15 l nur schwach gefärbtes Autolysat mit einem Gehalt von 111 E., d. i. 68% vom gesamten freigelegten Invertin.

B. Vorreinigung durch Alkoholfällung.

Die Fällung durch Alkohol war unentbehrlich (V. Abh., S. 210), um die frischen Neutralautolysate für die Kaolinadsorption geeignet zu machen; adsorptionshemmende [274] Eiweißabbauprodukte blieben in der 50proz. alkoholischen Mutterlauge zurück. Eine Schwierigkeit bestand aber darin, daß die Operation namentlich in großen Chargen bei ihrer unvermeidlichen Dauer von 20 bis 30 Minuten erhebliche Verluste an Enzym verursachte; in den Versuchen 1 bis 6 der Tab. 3 betrug die Ausbeute im Niederschlag nur 29 bis 66%. Die Mutterlaugen enthielten kein Invertin, die Fällung war dank den Begleitstoffen, Proteinen, Hefegummi und Phosphat, vollständig. Aber ein Teil des Enzyms fehlte und die Größe dieses Teils war abhängig von der Zeitdauer. Es gelingt, diese Enzymzerstörung zu vermeiden, wenn die Fällung aus angesäuerter Lösung, $p_H = 4,5$ bis 4,8, vorgenommen wird. Diese saure Reaktion wird mit pri-

märem Phosphat oder besser mit [275] Essigsäure so eingestellt, daß eine eben sichtbare Trübung die beginnende Fällung der Eiweißkörper anzeigt.

In den Versuchen der Tab. 3 sind nach der angegebenen Zeitdauer der Berührung mit Alkohol die mittels der Zentrifuge isolierten Fällungen sofort mit Wasser, worin sie sich nicht klar lösten, gut verrieben worden, um in der Suspension das noch vorhandene Invertin quantitativ zu bestimmen.

Tabelle 3. Invertinausbeute bei Fällung mit Alkohol (neutral und sauer).

Nr.	Autolysat ccm	Zusatz	p_H	Dauer der Einwirkung des Alkohols Min.	Ang. S.E.	In Susp. gef. S.E.	In Susp. gef. Proz. vom ang. Inv.
1	50		6,8	25	0,548	0,291	53
2	750		6,8	20 bis 25	8,20	5,45	66
3	455	—	7,0	25 ,, 30	3,91	1,60	41
4	500		7,0	30 ,, 35	4,31	1,26	29
5	500		7,0	30 ,, 35	4,21	1,32	32
6	500	—	6,8	25 ,, 30	4,85	2,33	48
7	38	2 ccm 0,1proz. Ammoniak	8,5	12	0,291	0,010	3,5
8	25		6,8	25	0,203	0,155	76
9	25		6,8	12	0,203	0,166	82
10	25	—	6,8	6	0,203	0,198	98
11	25	1 ccm 20proz. prim. Phosph.	5,5	12	0,203	0,162	80
12	25	3 ,, ,, ,, ,,	4,8	12	0,203	0,193	95
13	25	1,2 ccm n/1-Essigsäure	4,5	12	0,203	0,208	102
14	25	1,2 ,, ,,	4,5	25	0,203	0,198	98
15	50	3,3 ,, ,,		20	0,390	0,356	92
16	6600	300 ,, ,,		20 bis 30	50,5	50,1	99
17	15000	320 ,, 3n- ,,		20 ,, 30	111	104	94
18	4200	150 ,, ,,	–	20 ,, 30	72,5	72,0	99

Versuch Nr. 7 zeigt die fast vollständige Zerstörung des Invertins bei Anwendung ganz schwach ammoniakalischer Lösung; die Versuche Nr. 8 bis 10 zeigen die Abhängigkeit der Zerstörung von der Operationsdauer beim Fällen aus neutraler Flüssigkeit, Nr. 11 bis 18 die schützende Wirkung des Säurezusatzes.

Die aus 50proz. Alkohol erhaltenen Niederschläge waren viel geringer als aus den bei saurer Reaktion gewonnenen Autolysaten. Man zentrifugiert sofort; die Ausflockung von Eiweiß dauert fort, die zentrifugierten Lösungen trüben sich, aber die erste Fällung enthält schon alles Enzym[1].

Für die weitere Reinigung des Invertins mit Kaolin darf die Fällung nicht in Wasser, noch weniger in alkalihaltigem Wasser aufgelöst werden. Sonst geht zu viel von den Proteinen mit in Lösung, so daß die Adsorption an Kaolin gestört würde (s. Tab. 12, Nr. 14). Der Niederschlag wird besser mit bestimmten Mengen n/100- bis n/50-Essigsäure ausgezogen, wobei ein Teil der Proteine zurückbleibt, ein anderer Teil in den nicht einmal sauer reagierenden Auszug mitgeführt wird.

Beispiel: Die Fällung mit Alkohol wurde bei Verarbeitung großer Mengen Autolysat, z. B. von 15 l, enthaltend 111 E., in einzelnen Anteilen ausgeführt, wie sie sich

[1] Vgl. H. v. EULER und K. JOSEPHSON, Chem. Ber. Bd. 55, S. 446 [1923], und zwar S. 449.

mit unserer Zentrifuge bewältigen lassen. Je 1,4 l Autolysat versetzten wir mit 30 ccm 3n-Essigsäure bis zu beginnender Trübung und fällten mit 1,43 l 96proz. Alkohol. Den Niederschlag, der anfangs fein ist und bald grobflockig wird, trennten wir während höchstens einer halben Stunde in der Zentrifuge [276] von der Mutterlauge und verrieben ihn mit 0,7 l $^n/_{50}$-Essigsäure. Schließlich wurden die vereinigten Chargen, 7,5 l, durch möglichst scharfes Zentrifugieren von den unlöslichen Anteilen getrennt, und, wenn die Lösung noch nicht ganz klar war, durch Zusatz von Kieselgur und Filtrieren vollständig geklärt. So gewannen wir 104 E., also 94% vom angewandten Invertin, dessen Konzentration von S.W. 0,00794 auf 0,0307 gestiegen war.

C. Kaolinadsorption und darauffolgende Eiweißausfällung.

Das Invertin nach der Reinigung durch Alkoholfällung ließ sich, wenn man es vollständig auflöste, vom Kaolin nur mit einem für präparative Zwecke zu ungünstigen Adsorptionswert von 0,033 bis 0,036 bei einem Adsorptionsgrad von 17 bis 18% adsorbieren. Fällt man aus einer solchen Lösung mit Schwefelsäure und Calciumchlorid das Protein teilweise aus, oder einfacher, löst man aus der Fällung das Invertin durch essigsäurehaltiges Wasser nur zusammen mit einem Teil der Proteine heraus, so steigt der Adsorptionswert des Kaolins sogar bei vollständiger Adsorption auf so günstige Werte (0,08 bis 0,14) wie bei der Anwendung gealterter Autolysate. Die Adsorption verläuft am besten bei einer Acidität von $^n/_2$-Essigsäure und einer Verdünnung von 1 E. in 400 bis 600 ccm. Unter diesen Umständen fällt das Eiweiß vor dem Eintragen des Kaolins aus und wird von diesem aufgenommen, während es bei großer Verdünnung störende Emulsionen verursacht. In der Mutterlauge bleibt viel Hefegummi zurück. Am Kaolin (bis zur Elution mit 0,05proz. Ammoniak) gewährt dann das Eiweiß dem Invertin einen wichtigen Schutz. Man erreicht infolgedessen beim Eluieren Ausbeuten von mindestens 80, oft über 90%, also (vgl. Tab. 4) viel mehr als sonst bei jungen Neutralautolysaten und sogar mehr als bei der Verarbeitung gealterter Autolysate.

Tabelle 4.
Kaolinelutionsausbeuten bei verschieden vorbehandelten Autolysaten.
(Ang. mit konz. Salzs. beh. Kaolin.)

Nr.	Art des Autolysates	Vorbehandlung	Acidität	Verd. 1 E. in ccm	Elutionsausbeute	Zitat
1	frisch; sauer	Enteiw. m. Eisensalz	$^n/_{20}$-Essigs.	8000	75	V. Abh., Tab. 4, Nr. 11
2	gealtert; sauer	keine	$^n/_{20}$-Essigs.	8000	65	V. Abh., Tab. 5, Nr. 4
3	frisch; neutral	Enteiw. m. Schwefels.; Alk.-Fällg.	$^n/_4$- bis $^n/_2$-Essigs.	2000 bis 5000	40 bis 62	vorl. Abh., Tab. 14
4	frisch; neutral	Alk.-Fällg. ohne Enteiw.	$^n/_2$-Essigs.	2000	100	—
5	frisch; neutral	Alk.-Fällg. ohne Enteiw.	$^n/_2$-Essigs.	500	87	—

Aus der Elution, die dafür zu einem Gehalt von etwa 30 bis 55 E. in 1 l eingeengt werden muß, wird durch Ansäuern mit Schwefelsäure unter Zusatz von Calciumchlorid miteluiertes Eiweiß abgeschieden. Es ist, wenn man die frischen [277] Autolysate so rasch wie möglich den beschriebenen Operationen unterzieht, noch so wenig verändert, daß es zum größten Teil ausfällt. Mit Rücksicht auf die Säureempfindlichkeit des Invertins muß die erforderliche Säuremenge genau ausprobiert werden.

Beispiel: 98 S.E. Invertin in $^n/_{50}$-essigsaurer Lösung aus der Alkoholfällung unterwarfen wir in 5 Anteilen der Adsorption. 20 E. in 1680 ccm versetzten wir mit 2,4 l Wasser und 3,33 l 3n-Essigsäure und trugen in die stark getrübte Flüssigkeit 610 ccm Suspension von salzsäurebehandeltem Kaolin (134 g) ein, so daß die Adsorption bei einer Verdünnung von 1 S.E. in 500 ccm $^n/_2$-Essigsäure geschah. Die Suspension wird so rasch wie möglich auf einer breiten Steinzeugnutsche mit doppelter Lage Filterpapier abgesaugt, was nicht mehr als 5 Minuten dauern soll. Die Restlösung enthielt noch 1,22 E., der Adsorptionswert hat also 0,14 betragen. Nach dem Auswaschen trugen wir das Adsorbat in Porzellanschalen ein und verrührten es, um zu eluieren, mit 1,5 l 0,05proz. Ammoniak. Die Elution wurde auf mehreren Nutschen durch gehärtete Filter gesaugt und mit Essigsäure neutralisiert. In diesem Zustand sammelte man [278] die ganze Menge. Aus den angewandten 98 E. erhielten wir bei einer Elutionsausbeute von 87% 80 S.E. Die gesamte Flüssigkeit dampften wir im Vakuumapparat bei 13 bis 14° auf 1,57 l ein.

Die für die Eiweißausfällung erforderliche Säuremenge ergab sich beispielsweise aus folgenden Vorproben:

1. 5 ccm der eingeengten Elution (0,250 E.) wurden mit 1 ccm 20proz. $CaCl_2$ und mit 0,2 ccm $^n/_2$-H_2SO_4 versetzt, durchgeschüttelt und rasch zentrifugiert. Nach höchstens 4 Minuten konnte die von der Fällung getrennte Lösung mit einem weiteren Tropfen Schwefelsäure geprüft werden. Sie trübte sich; die Säure hatte also nicht gereicht.

2. Eine gleiche Probe wurde mit 0,4 ccm $^n/_2$-H_2SO_4 versetzt. Ein Teil der zentrifugierten Flüssigkeit blieb mit Schwefelsäure klar; ein anderer Teil, mit etwas $CaCO_3$ neutralisiert und quantitativ bestimmt, enthielt 0,185 E.; also Enzymverlust 25% durch Säurewirkung.

3. Ebenso mit 0,3 ccm $^n/_2$-H_2SO_4; ebenfalls klar auf Säurezusatz. Die Ausbeute, bei idealer Filtration, betrug 0,222 E., der Verlust 11%.

4. Mit 0,25 ccm $^n/_2$-H_2SO_4 Ausbeute 0,244 E., also 2% Verlust.

Die Ausfällung von Eiweiß nahmen wir in vielen (13) Anteilen vor, um die Versuchsdauer tunlichst abzukürzen und Invertinzerstörung durch die Säure zu vermeiden. Je 120 ccm (6 S.E.) versetzten wir mit 24 ccm 20proz. $CaCl_2$-Lösung, wodurch eine starke Trübung entstand, und mit 6 ccm $^n/_2$-Schwefelsäure, die eine dichte, sich zusammenballende Proteinfällung erzeugte. Mittels einer kleinen, sehr rasch an- und auslaufenden Zentrifuge trennte man die Enzymlösung vom Niederschlag und neutralisierte sie spätestens 5 Minuten nach Versuchsbeginn mit einer kleinen Menge gefällten Calciumcarbonats. Das gesamte Filtrat enthielt 72,0 E., also 91%; die Ausbeute wäre ohne das Zurückbleiben von Invertinlösung in der abzentrifugierten Eiweißfällung quantitativ gewesen. Nach Einengen im Vakuum auf 510 ccm und zweitägiger Dialyse betrug die Ausbeute 65 S.E.

In diesem Beispiel (Nr. 1, Tab. 5, ähnlich Nr. 2 und 3) ist das Invertin allein durch die Ausfällung des durch das Kaolin mitgeführten Proteins 5,6mal konzentrierter geworden; der Saccharasewert betrug 1,08 (Zeitwert 0,93). Das Ergebnis war durch Anwendung invertinreicher Hefe (Zeitwert 145) zu [279] übertreffen. Der Adsorptionswert des Kaolins war dann viel günstiger, nämlich 0,30. Die Saccharasekonzentration stieg vom Zeitwert 62 des Autolysates bei der geschilderten Reinigung auf 1,79 (Zeitwert 0,56; Nr. 5 der Tab. 5). Alle diese Präparate gaben starke Hefegummireaktion, während die Millonreaktion negativ und die Ninhydrinprobe schwach ausfiel.

Tabelle 5.
Invertin nach der Alkoholfällung, Kaolinadsorption und Enteiweißung.

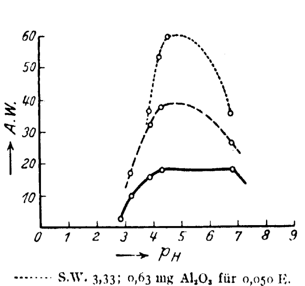
Nr.	Saccharaseeinheiten				S.W.	
	Autolys.	Lösg. aus der Alkoholfällung	Ads. an Kaolin	Eluiert aus Kaolin	eiweißhaltig	vom Eiweiß befreit
1	111	104	92,0	80	0,102	1,08
2	31	28	26,6	21,5	—	1,00
3	21,4	17,3	16,7	15,5	0,177	0,985
4	3,27	2,84	2,20	1,98	0,156	—
5	53,1	48,8	42,0	33,6	—	1,79

D. Tonerdeadsorption bis zur Grenze des Leistungsvermögens.

Die beschriebenen Invertinlösungen aus frischen Neutralautolysaten dienten als Ausgangsmaterial für Adsorption durch Tonerde mit dem Ziel, das Enzym möglichst vollständig von seinen Begleitstoffen zu trennen. Dabei ist zu beachten, daß der Saccharase noch andere Kohlehydrate spaltende Enzyme beigemischt sind und daß alle diese Enzyme auch Zersetzungsprodukte (inaktiviertes Enzym) und Vorstufen enthalten können. Die Adsorptionsmethode ist nämlich bis jetzt nur wenig für die Trennung des Enzyms von diesen nächst verwandten Stoffen ausgebildet worden.

Die Adsorptionsmethode wird im folgenden öfters so gehandhabt, daß eine Fraktionierung erfolgt, nämlich so, daß ein Teil des Enzyms mit Tonerde weggenommen und die Restlösung für sich weiter verarbeitet wird (Voradsorption). Zumeist wird aber die Hauptmenge (80 bis 90% des Enzyms) des Invertins aufgenommen und vollständig oder fraktionenweise eluiert. Für alle Versuche diente ein und dasselbe Präparat [280] des Aluminiumhydroxyds C. In einigen Fällen erfolgte die Adsorption aus neutraler Lösung, zu allermeist in schwach saurer Lösung, in diesem Falle, übereinstimmend mit unseren früheren Angaben, mit höheren Adsorptionswerten.

Im Einklang mit den voranstehenden Angaben von H. Kraut und E. Wenzel fanden wir maximale Adsorptionswerte bei $p_H = 5{,}0$ und den Verlauf der Adsorptionswerts-p_H-Kurve steiler werdend bei zunehmender enzymatischer Reinheit des Invertins (Abb. 1). Die geeignetste Verdünnung, um mit maximalen Adsorptionswerten zu adsorbieren, war von Fall zu Fall zu ermitteln. Die rechte Verdünnung war bei der erstmaligen Anwendung der Tonerde 250 ccm für 1 S.E., bei höherem



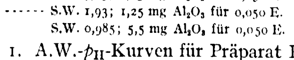
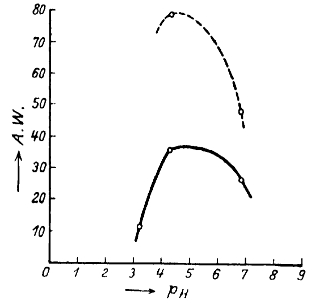


Abb. 1. A.W.-p_H-Kurven für Präparat B in 3 Reinheitsstufen in der Verdünnung von 1 E. in 500 ccm.



------ Verd. 1 E. in 50 ccm; 0,425 mg Al_2O_3 für 0,050 E.
——— Verd. 1 E. in 500 ccm; 2 mg Al_2O_3 für 0,050 E.

Abb. 2. A.W.-p_H-Kurven für Präparat A nach der ersten Tonerdeads. (S.W. 2,43) in Verdünnung 1 : 50 und 1 : 500 ccm.

Reinheitsgrad dagegen war der Adsorptionswert in konzentrierter Lösung größer (1 E. in 50 ccm). Die Abb. 2 und die [281] Kurven IIIa und IIIb der Abb. 5 zeigen, daß ein Präparat vom Zeitwert 0,41 bzw. 0,44 mit Adsorptionswert 78 bzw. 98 aus der konzentrierteren, mit Adsorptionswert 37 bzw. 72 aus der 10mal bzw. 5mal verdünnteren Lösung adsorbiert wird. Der Sinn dieses Unterschiedes wird in der voranstehenden Abhandlung von H. Kraut und E. Wenzel eingehend erläutert. Der Grund dieser Erscheinung beruht zum Teil auf dem wechselnden Adsorptionsverhalten der mit dem Invertin nicht zusammenhängenden Begleitstoffe. Es wird zudem bei der Erklärung zu berücksichtigen sein, daß im Falle der rohen Enzymlösung in verdünnter, namentlich saurer Lösung erfolgende hydrolytische Dissoziationen adsorptiv locker zusammenhängender Gemische von Enzym und Fremdstoffen eine Rolle spielen, während im reineren Zustand durch die Verdünnung und den Zusatz von Säure auch ein Zerfall der adsorptiv enger verbundenen Systeme von Invertin + Koadsorbentien eingeleitet werden kann.

Die Adsorptionswerte sind, wie einige Beispiele in der Tab. 6 zeigen, im Vergleich zu den früheren hoch gesteigert worden. Sie sind 6- bis 7mal höher als die besten in unseren früheren Arbeiten. Diese Werte haben natürlich nicht die Bedeutung von Konstanten; sie sind ja ungemein abhängig von der Sorte und Beschaffenheit der Tonerdepräparate, außerdem von den Bedingungen der Adsorption. Das Altern unserer Tonerde C im Laufe von 7 Monaten schien indessen keinen beträchtlichen Einfluß zu haben; das Adsorbens ist nur immer wieder mit Glaskugeln auf der Maschine geschüttelt worden. Die Umstände, auf denen die Verbesserung der Adsorption, nämlich die Steigerung der Adsorptionswerte beruhte, waren: zunehmende Reinheit der Präparate, Anwendung der jeweils geeigneten Verdünnung und optimalen Acidität.

Es ist allerdings zweifelhaft, ob für die präparativen Zwecke die Erzielung optimaler Adsorptionswerte durch geeignete Acidität so vorteilhaft ist. Es mag sein, daß die Adsorption bei weniger günstigem p_H, also mit der dann erforderlichen größeren Tonerdemenge, mehr auswählend vonstatten geht als bei optimaler Acidität.

[282] Tabelle 6. Adsorptionswerte der Tonerde für Invertin verschiedener Reinheit.

Nr.	Autolysat	Vorbehandlung	S.W.	Acidität	Verd. 1 E. in ccm	Ads.-Grad	A.W.	Zitat
1	frisch; sauer	keine	<0,0066	schwach sauer	—	—	0,17	I. Abh., S. 67
2	frisch; sauer	keine	<0,0066	schwach sauer (28%Aceton)			0,74	I. Abh., S. 67
3	sauer; 6 Wochen gealtert	Kaolin ohne Aceton	<0,0066	äußerst schwach sauer	3000	97	1,2	IV. Abh., Tab. I, Nr. 16
4	sauer; 6 Wochen gealtert	Kaolin mit Aceton	<0,0066	äußerst schwach sauer	4500	78	4,3	IV. Abh., Tab. 1, Nr. 19
5	sauer; lang gealtert	Kaolinadsorption	1,67	schwach sauer	1400	94,5	19,5	IV. Abh., Tab. 1, Nr. 28
6	frisch; sauer	eine Tonerdefraktionierung	2,7	neutral	40	95	17,0	V. Abh., Tab. 13, Präp. k_1
7	sauer; lang gealtert	mehrmalige Tonerdefraktionierung	3,7	n/40-Essigsäure	40	77	30,0	V. Abh., Tab. 11, Präp. g_7
8	neutral; frisch	Alkoholfällg., Kaolinads., enteiweißt, Tonerdeads.	2,43	n/2500-Essigsäure	50	90	77	diese Abh., Präp. A
9	ebenso; invertinreiche Hefe	Alkoholfällg., Kaolinads., enteiw., 3 Vorads., 2 Ads.	4,20	n/1000-Essigsäure	57	84	129	diese Abh., Präp. D
10	neutral; frisch	Alkoholfällg., Kaolinads., enteiw., 4 Vorads., 2 Ads.	3,37	n/1000-Essigsäure	61	86	162	diese Abh., Präp. C
11	ebenso	ebenso + 1 Ads.	4,75	n/1000-Essigsäure	50	93	196	diese Abh., Präp. C

[283] Unsere präparative Anwendung der Tonerdeadsorption war eng verbunden mit der Untersuchung über Enzymadsorption von H. KRAUT und E. WENZEL[1], deren erster Teil vor einigen Monaten veröffentlicht wurde und deren Fortsetzung die voranstehende Abhandlung enthält. Die Adsorptionsmethode wird nämlich durch Prüfung der Adsorptionskurve des Invertins in jedem Reinheitszustand vom Autolysat bis zum Ende so geleitet, daß sich das Adsorptionsverhalten mehr und mehr und schließlich fast ganz dem eines einheitlichen Stoffes nähert. Einen solchen Fall zeigt die Abb. 3. Sie gibt die Adsorptionskurve eines unserer Invertinpräparate wieder vom Saccharasewert 2,14 (Zeitwert 0,47) nach Voradsorption und erster und zweiter Tonerdeadsorption (Präp. A der Tab. 8). Bei den letzten Vornahmen ist eine Wirkungseinbuße von 39% erfolgt, ohne welche der Saccharasewert 3,58 gewesen wäre. Eine so schöne Form der Adsorptionskurve ist indessen

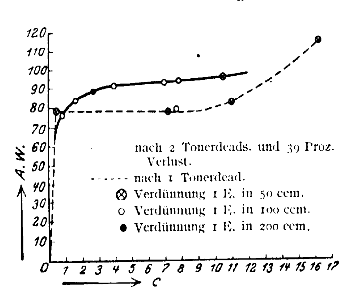


Abb. 3. Adsorptionskurven von Präparat A in 2 Reinigungsphasen.

[1] Diese Zs. Bd. 133, S. 1 [1923/24].

bei wiederholter Anwendung der Tonerdeadsorption nicht immer erreicht worden. Das beste Präparat dieser Gruppe, ein aus invertinreicher Hefe stammendes Präparat vom S.W. 6,67 (Zeitwert 0,15), das durch Voradsorption, Adsorption, erneute Adsorption und dritte Adsorption gereinigt wurde, ergab nach 11% Verlust (beim dreitägigen Aufbewahren) eine Adsorptionskurve, Abb. 4, die noch abtrennbare Beimischungen anzeigt. Ebenso war auch an dem besten Präparat der V. Abhandlung (Tab. 11, Präp. g_8, S.W. 5,35) nicht das Adsorptionsverhalten [284] eines reinen Stoffes beobachtet worden, ein Ende der systematischen Anwendung des Adsorptionsverfahrens also nicht erreicht[1].

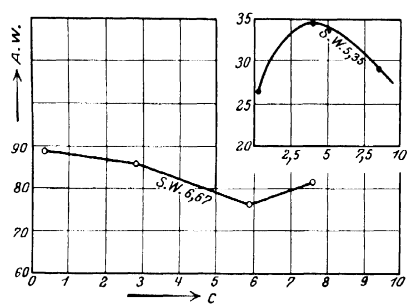


Abb. 4. Adsorptionskurven von Präp. D (S.W. 6,67) und Präp. g_8 (Abh. V, Tab. 11, S.W. 5,35).

Die Adsorption mit Tonerde suchten wir also derart anzuwenden, daß das Ende der Wirkung des Adsorbens erreicht wurde. Die Begleitstoffe (wie Hefegummi, die Ninhydrinreaktion gebenden Stoffe und andere), die nach dieser Methode überhaupt in irgendeinem Falle abgetrennt werden konnten, müssen in jedem Beispiel abgetrennt werden. Der Zeitwert muß in jedem Fall so weit gesteigert werden, als es mit dem gegebenen Material von Hefeautolysat nach diesem Verfahren möglich ist. Die Adsorptionskurve soll sich der eines einheitlichen Stoffes annähern. Ist aber dieses Ziel erreicht, so zeigt es sich, daß das Invertin dennoch von der Einheitlichkeit eines reinen Stoffes weit entfernt ist. Dieselbe Kritik ist geboten, wenn mit der Adsorptionsmethode analoge Erfolge bei den aktiven Stoffen der Heilseren oder z. B. bei der Reinigung von Insulin angestrebt werden. Die gefundene Adsorptionskurve ist nämlich nicht die des Invertins, sondern die eines invertinführenden Begleitstoffes, genauer die eines Aggregates, bestehend aus Invertin und den ihm am nächsten verwandten Stoffen (wie andere Enzyme, Zersetzungsprodukte und [285] Vorstufen der Enzyme) zusammen mit, d. h. adsorptiv verbunden mit einem Koadsorbens oder mit mehreren untereinander adsorptiv verbundenen Koadsorbentien. Der erreichte Zustand ist eine Grundlage für weiter eindringende Untersuchungen. Es ist zu ermitteln, welche Änderungen in den Adsorptionsbedingungen die Assoziation des Invertins mit seinen Koadsorbentien derart beeinflussen, daß mit demselben Adsorbens, außerdem und wohl leichter mit andern Adsorbentien entweder ein Teil der Begleitstoffe oder das Invertin selbst mehr auswählend adsorbiert wird. Aber diese Untersuchung wird zu einer Schranke gelangen. Die weiteren Erfolge der Adsorptionsmethodik werden mit Verlust an Beständigkeit der Saccharase bezahlt werden. Dadurch wird die Möglichkeit beschränkt, zum reinen Enzym vorzudringen.

[1] Siehe dazu H. KRAUT und E. WENZEL, Diese Zs. Bd. 133, S. 1 [1923/24], Kurve 3 der Abb. 6, S. 14.

Die besten Präparate der hier behandelten Art kommen nur sehr schwer, manche auch nicht, zu so hohen enzymatischen Konzentrationen wie das Invertin aus gealterten Autolysaten. Dies ist der Fall, trotzdem sich die neuen Präparate durch ihre Beständigkeit gegenüber dem Adsorbens auszeichnen und wiewohl auf dem ganzen neuen Wege der Reinigung Schädigung der Zeitwerte durch Inaktivierung vermieden werden konnte. Diese neuen Präparate sind gegen Zersetzung im Tonerdeadsorbat geschützt, wie sie bei dem Invertin aus gealterten Autolysaten früher beobachtet wurde, und sie sind in dieser Beziehung weit beständiger als die im Abschnitt II zu behandelnden Präparate aus frischen, von Eiweiß sofort befreiten Autolysaten. Erst in der Dialyse traten Enzymverluste von wechselnden Beträgen ein, manchmal kleine Verluste, in anderen Fällen Einbußen bis zu 60%. Der Vergleich mit unseren anderen Arbeitsweisen zeigt uns, daß wir aus denselben Autolysaten mit den Adsorptionsmethoden Invertin von höheren Zeitwerten zu gewinnen imstande wären, wenn wir wie früher die Autolysate durch die enzymatischen Vorgänge der Alterung verbessern würden. Die analytische Untersuchung im IV. Abschnitt lehrt, daß die enzymatische Konzentration der Präparate dieses I. Abschnittes durch die Assoziation der Saccharase mit dem tryptophanreichen Begleitstoff herabgedrückt wird.

[286] Von den folgenden Tabellen gibt Nr. 7 einen Vergleich der nach unseren verschiedenen Verfahren gewonnenen besten Präparate und Nr. 8 stellt einige Präparate der hier behandelten Isolierungsweise zusammen, von denen nur ein Beispiel beschrieben werden soll. Es ist dasselbe Präparat C, dessen Adsorptionsverhalten im Laufe der Reinigung in der Abb. 5 dargestellt ist.

Tabelle 7. Invertinpräparate der verschiedenen Darstellungsweisen.

Zitat	IV. Abh.	III. Abh., Präp. l, m, q	V. Abh., Abschn. II, D	V. Abh., Tab. 13, Präp. m_2	diese Arbeit, Tab. 8, Präp. D
Autolysat	gealtert	gealtert	gealtert	gealtert	frisch, neutral aus invertinreicher Hefe
Verfahren der Isolierung	Kaolinadsorpt. aus sehr verd. saurer Lösung	Bleifällung, Tonerdeadsorption, eine oder zwei weitere Bleifällungen	Alkoholfällung, Kaolinads. aus verd. mögl. saurer Lösung (S.W. 3,52), Tonerdeads.	Alkoholfällung, Kaolinads. aus mögl. saurer Lösung Frakt. durch Tonerde	Alkoholfällung, Kaolinads., Eiweißfällung, systematische Tonerdeadsorption
Reinheitsgrad					
Zeitwert	0,5	0,30—0,20 (meist ind. best.)	0,187	0,163	0,15
S.W.	2	3,33—5	5,35	6,14	6,67
If	122	200—300	325	374	406

Beispiel:

Die durch Kaolinadsorption gereinigte, von Eiweiß befreite Invertinlösung von 65 E. und S.W. 1,08 ließ sich durch Tonerde C nur mit sehr ungünstigem Adsorptions-

wert adsorbieren, wie die Kurve I zeigt. Man erkannte aus ihr, daß es angezeigt war, durch Voradsorption mit kleinen Tonerdemengen die Lösung von Begleitstoffen zu befreien, die das Adsorbens in erster Linie beanspruchen. Dies geschah in 2 Malen

[287] Tabelle 8.
Invertin aus frischen Neutralautolysaten; Adsorption mit Tonerde nach Enteiweißen.

Präparat; S.W. nach Kaolinads.	Adsorptionsvornahme	Acidität	Verd. 1 E. in ccm	Ads.-Grad	A.W.	El.-Ausbeute[1], Prozent vom ads. Invertin	Dialys.-Verluste Proz.	S.W.[2]
A	Vorads.	neutral	50	5,3	1,4	—	—	—
1,00	I. Ads.	n/20-Natriumacetat	500	87	19,4	59,5 (85)	—	2,43
	II. Ads.	n/2500-Essigs.	50	90	77	61 (78)	39	2,14 (3,58)
B	I. Ads.	neutral	500	92	18,2	67 (88)	—	1,93
0,985	II. Ads.	n/2500-Essigs.	50	95	40,2	54 (77)	—	3,33
	III. Ads.	n/5000-Essigs.	50	92	51	82 (95)	63	1,37 (3,45)
C	Vorads.	neutral	200	5,2	4,1	—	—	—
1,08	Vorads.	neutral	200	10,1	9,8	—	—	—
	I. Ads.	n/1000-Essigs.	250	80	41,2	90	—	2,27
	Vorads.	n/1000- ,,	55	7,1	39	—	—	—
	II. Ads.	n/1000- ,,	63	88	115	83	—	3,37
	Vorads.	n/1000- ,,	50	17	210	37,5	—	—
	III. Ads.	n/1000- ,,	61	86	162	98	—	4,75
	IV. Ads.	n/1000- ,,	50	94	196	90	15	4,35 (5,00)
D	Vorads.	neutral	50	9,1	24	—	—	—
1,79	Vorads.	neutral	56	20,7	50	—	—	2,27
	I. Ads.	n/1000-Essigs.	250	88	63	95	{ 21 gew. D. 21 El. D. }	2,45 (3,13)
	II. Ads.	n/1000-Essigs.	50	80	83	75	5	3,58 (3,85)
	Vorads.	neutral	50	13,5	46	—	—	4,20
	III. Ads.	n/1000-Essigs.	57	84	129	88	14	6,67

unter [288] Abtrennung von 4 und 10% des Invertins. Das Adsorptionsverhalten des Enzyms änderte sich dabei beträchtlich (Kurve II). Das Invertin war nach dieser Reinigung mit dem Adsorptionswert 41 für den Adsorptionsgrad 80 adsorbierbar.

Tabelle 9. Beispiel C der planmäßigen Tonerdeadsorption.

	Angew. 58 E. vom S.W. 108 nach Kaolinads. u. Eiweißfällung;	Ads.-Kurve I, Abb. 5
	Vorads. (4,2%) in Verd. 1 E. in 200 ccm, neutral, mit 0,6 g bei A.W. 4,1. Restlösung 56,7 E.	
	Vorads. (10,1%) unter denselben Bed. mit 0,6 g bei A.W. 9,8. Restlösung 50,8 E.; weiter verarb. 49 E.	Ads.-Kurve II, Abb. 5
I. Ads.	n/1000-Essigs., 1 E. in 250 ccm, mit 0,95 g bei A.W. 41,2; Ads.-Grad 80.	
	Elution (n. Vorel. von 2,25 E. mit NH_3) mit Phosph., einged., dialys. 35,3 E.; S.W. 2,27, weiter verarb. 25,5 E.	Ads.-Kurve IIIa u. IIIb, Abb. 5
	Vorads. (7,1%) n/1000-Essigs., 1 E. in 55 ccm; mit 0,053 g bei A.W. 39; el. S.W. 0,7. Restlösung 23,7 E.	

[1] Die eingeklammerten Zahlen enthalten die Gesamtelutionsausbeute bei fraktionierter Elution.

[2] Die eingeklammerten Saccharasewerte sind aus der Wirksamkeit vor dem Eindampfen und der Dialyse und dem Trockengewicht nach dieser abgeleitet.

Tabelle 9. (Fortsetzung.)

II. Ads.	$^{n}/_{1000}$-Essigs., 1 E. in 63, mit 0,182 g bei A.W. 115, Ads.-Grad 88. (Restlösung S.W. 0,80.)	
	Elution mit Phosph. 17,4 E. (83 %), nach Dial. 16,9 E. S.W. 3,37, nach 8 Tagen 2,76, weiterverarb. 12,3 E.	Ads.-Kurve IV, Abb. 5
	Vorads. (17 %) $^{n}/_{1000}$-Essigs., 1 E. in 50, mit 0,01 g bei A.W. 210, mit Ads. von 2,1 E. zerstört 71 %. Restlösung 10,2 E.	
III. Ads.	$^{n}/_{1000}$-Essigs., 1 E. in 61, mit 0,053 g bei A.W. 162, Ads.-Grad 86.	
	Elution 8,2 E. (98 %), nach Dial. 8,2 E., filtr. von etwas Tonerde 7,4 E., S.W. 4,75. (10,4 % N; 8,8 % Tryptophan.)	Ads.-Kurve V, Abb. 5
IV. Ads.	$^{n}/_{1000}$-Essigs., von 2 E. in 100 ccm mit 9,5 mg 1,87 E., A.W. 196.	
	Elution 1,68 E., nach Dialyse 1,55 E., nach Filtr. und El.-Dialyse 1,32 E. S.W. infolge dieses Verlustes 4,35 (S.W. 5,00). (10,6 % N; 9,4 % Tryptophan.)	

[289] Es ist wahrscheinlich, daß es sich dabei um eine kleine Menge nicht mehr unveränderten, durch Säure nicht mehr fällbaren Proteins handelt. Auch im weiteren Verlauf der Reinigung erschien es noch mehrmals angezeigt, Voradsorption oder fraktionierte Adsorption auszuführen. Die Adsorptionskurve IV, die mit der Elution nach zweimaliger Durchführung der Tonerdeadsorption ermittelt wurde, zeigt, daß ein Teil des Invertins leichter adsorbierbar ist, als die Hauptmenge. Es wurde versucht, mit Tonerde die leichtest adsorbierbare Fraktion zu isolieren. Mit einem Adsorptionswert von 210, dem höchsten bisher beobachteten, trennten wir 17 % des Enzyms ab. Dieser Teil war leider im Gegensatz zur Hauptmenge und zu allen anderen hier untersuchten Invertinpräparaten so unbeständig bei der Adsorption, daß bei sofortiger Bestimmung des Adsorbates 71 % vom aufgenommenen Invertin fehlten. Während das Invertin zuvor beim Adsorptionsgrad 75 mit A.W. 151 adsorbierbar war, ergab sich danach bei demselben Adsorptionsgrad A.W. 162.

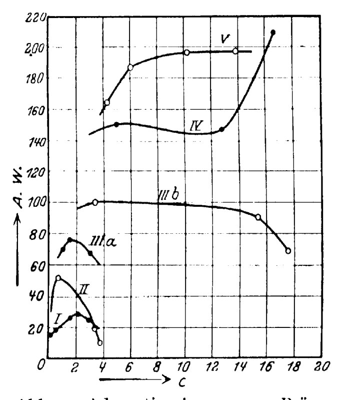


Abb. 5. Adsorptionskurven von Präparat C in verschiedenen Reinheitsstufen.

Außer diesen Fraktionierungen des Invertins durch Voradsorption ist das Invertin 3 mal in seiner Hauptmenge der Tonerdeadsorption unterworfen worden. Nach der ersten solchen [290] Reinigung ließ sich auf Grund des Vergleichs der Adsorptionskurven IIIa und IIIb, die mit der Verdünnung von 1 S.E. in 250 und 50 ccm bestimmt sind, annehmen, daß sich die Invertinlösung, nachdem sie zuvor an den aus konzentrierter Lösung leichter adsorbierbaren Fremdstoffen ärmer gemacht worden, nun durch Adsorption von den in konzentrierter Lösung schlechter adsorbierbaren Begleit-

stoffen trennen lassen würde. Die Adsorption aus konzentrierterer Lösung ergab einen viel günstigeren Adsorptionswert. In dieser Konzentration (1 E. in 50 ccm) wurde daher gearbeitet.

Bei der präparativen Ausführung der Adsorption begegnete man öfters Abweichungen in den Adsorptionswerten von den in kleineren Vorversuchen, z. B. bei Bestimmung der Kurven, gefundenen Zahlen. Die Reproduzierbarkeit der Versuche, namentlich bei Änderung des Maßstabes, ist keine vollkommene [1]. Es kamen in einzelnen Fällen sogar große, noch nicht erklärliche Abweichungen vor. Beispielsweise war bei der vierten Adsorption, ausgeführt mit 2 E., der A.W. (196) erheblich größer als die Adsorptionskurve der angewandten Invertinlösung vorhersagte.

Die Arbeitsweise soll an der ersten Tonerdeadsorption beschrieben werden, die nach der Reinigung durch Voradsorption mit 49 E. ausgeführt wurde. Mit dieser Menge arbeitete man in fünf Anteilen: 9,8 E. brachten wir unter Zusatz von 2,45 ccm $^n/_1$-Essigsäure auf das Volumen von nahezu 2,5 l. Die Tonerdesuspension (0,191 g Al_2O_3 in 60 ccm) trug man auf einmal unter heftigem Umschütteln ein. Dann trennten wir die Restlösung vom Adsorbat in der Zentrifuge mit sechs $^1/_2$-l-Bechern. Die Adsorbate der einzelnen Chargen verrührte man, um sie auszuwaschen, sorgfältig mit destilliertem Wasser und sammelte alle fünf, zusammen mit $2^1/_2$ l Wasser. [291] Darauf trennten wir wieder mit der Zentrifuge die gesamte Tonerde vom Waschwasser und bewirkten in den Zentrifugenbechern durch Verrühren mit dem Eluens die Freilegung des Enzyms. In unserem Fall wurde dieser Prozeß in Fraktionen ausgeführt, mit 0,05proz. Ammo-

Tabelle 10. Reaktionen einiger Invertinpräparate.

Reaktion, ausgeführt mit	MILLON 4 mg	Ninhydrin 2 mg	Tryptophan 5—14 mg	Hefegummi nach SALKOWSKI 5 mg	Hefegummi FEHLING nach Erhitzen mit Säure 5 mg
Präparat A					
nach I. Ads.	negativ	schwach	—	gering	—
nach II. Ads.	,,	spurenweise		negativ	—
Präparat B					
nach I. Ads.	,,	schwach	—	mittelstark	—
nach II. Ads.	,,	sehr schwach	—	—	spurenweise
nach III. Ads.	,,	spurenweise	—	negativ	negativ
Präparat C					
nach I. Ads.	,,	schwach	sehr stark	mittelstark	
nach II. Ads.	,,	äußerst schwach	,, ,,	—	gering
nach III. Ads.	,,	spurenweise	,, ,,	negativ	negativ
Präparat D					
nach I. Ads.	,,	äußerst schwach	,, ,,	mittelstark	—
nach II. Ads.	,,	spurenweise	,, ,,	—	—
nach III. Ads.	,,	,,	,, ,,	negativ	negativ

[1] Nicht immer konnten die Bestimmung der Adsorptionskurven und die präparative Verarbeitung, aus der der Adsorptionswert für einen gewissen Adsorptionsgrad hervorging, zu gleicher Zeit vorgenommen werden. Wenn aber das Invertin beim Stehen der Lösung einer teilweisen Inaktivierung anheimfiel, so wurde der Adsorptionswert erniedrigt und in manchen Fällen die Adsorptionskurve verändert.

niak ein kleiner Teil eluiert und die Hauptmenge durch zweimalige Behandlung mit 0,5proz. Diammonphosphat (zuerst 650, dann 360 ccm). Die vereinigten Phosphatelutionen, im Vakuum auf 250 ccm eingeengt und durch 3tägige Dialyse von Elektrolyten befreit, ergaben 35,3 E. vom S.W. 2,27. Für die Bestimmung der enzymatischen Konzentration ist die Lösung in allen Fällen nach der Dialyse vollends durch Elektrodialyse gereinigt worden.

Durch zwei weitere Adsorptionen erhöhte sich die enzymatische Konzentration auf S.W. 3,37 und 4,75. Damit war das Ende der Nützlichkeit des Verfahrens erreicht. Eine [292] nochmalige, d. i. vierte Adsorption ergab keine Verbesserung mehr, sondern eine scheinbare kleine Abnahme des Saccharasewertes, bedingt durch Enzymeinbuße bei der Dialyse, der ersten, die im Gang dieses Versuches vorkam.

Über die Reaktionen der Fremdstoffe, die dem Invertin hartnäckig zu folgen pflegen, gibt die Tab. 10 Aufschluß. Der Hefegummi war schwer vollständig zu beseitigen. Diese Präparate C und D, ähnlich die anderen dieser Gruppe, gaben nach der ersten Tonerdeadsorption noch einen kräftigen Niederschlag mit Fehlingscher Lösung. Auch die zweite Adsorption beseitigte den Hefegummi nicht vollständig. Nach der dritten enthält das Invertin endlich keine Spur von Hefegummi mehr. Die Tryptophanreaktion war positiv und zwar sehr stark; die Millonprobe war bei allen diesen Präparaten vollkommen negativ, nur eine schwache bräunliche Färbung trat ein.

II. Verarbeitung frischer Neutralautolysate unter frühzeitiger Ausfällung von Eiweiß.

(Tryptophanarmes und tryptophanfreies Invertin.)

A. Enteiweißung sofort nach der Autolyse.

Die frischen Neutralautolysate zeigten gegen Säure dasselbe Verhalten, wie es J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper[1] an Hefepreßsäften beobachteten und mit Vorteil anwandten, um durch Beseitigung von Eiweiß das Invertin reiner zu erhalten. Die Menge des Eiweißniederschlags betrug nämlich $^1/_3$ bis $^1/_2$ der Trockensubstanz des Hefepreßsaftes. Bei den mit saurer Reaktion gewonnenen frischen Autolysaten und bei allen gealterten bot sich uns bisher keine Möglichkeit, die Eiweißstoffe für dieses Verfahren genügend unverändert zu halten, während sich auf die Fällung durch Bleiacetat, besonders mit gealterten Autolysaten, die Isolierungsweise der III. Abh. gründen ließ. So wie nach dieser aus jungen Neutralautolysaten mit Bleiacetat das Eiweiß fast ohne Invertin ausfällt, so geschieht es auch bei der Fällung mit Säure. Hingegen enthält der [293] Proteinniederschlag nach einer noch unveröffentlichten Untersuchung von R. Willstätter und W. Grassmann den größten Teil der Hefeprotease.

Zur Fällung fanden wir Schwefelsäure und Salzsäure geeigneter als Oxalsäure. Wenn der Fällungspunkt bei $p_H{}^\bullet = 3{,}5$ bis 4 erreicht ist, so wird die Abscheidung

[1] Biochem. Zs. Bd. 54, S. 108 [1913].

durch Zugabe weiterer Säuremengen vervollständigt, die ganz an den Niederschlag gebunden werden. Das Invertin leidet infolgedessen gar nicht, wie die Versuche der Tab. 11 zeigen.

Beispielsweise wurden 4,8 l Autolysat, enthaltend 40 E., mit 212 ccm 2n-Schwefelsäure unter tüchtigem Umschütteln versetzt. Der in der Zentrifuge abgetrennte Niederschlag enthielt das Eiweiß in geschontem Zustand. Es war frei von Phosphorsäure. Die Mutterlauge, mit Calciumcarbonat geschüttelt und filtriert, wies in 4,32 l 33,9 E. auf, d. i. 85 %, und sie enthielt ungeachtet der kurzen Autolysendauer eine reichliche Menge von Eiweißspaltprodukten, die starke Ninhydrinreaktion gaben.

Der Saccharasewert des angewandten Autolysates war 0,00795. Er stieg durch die Beseitigung von Eiweiß (aus 100 ccm Autolysat 2,21 g, d. i. 42 % des Trockengewichts) auf 0,0135 und nach Ausfällung von Calciumphosphat und 6tägiger Dialyse auf 0,054 (Zeitwert 18,5). Danach fiel die Millonprobe negativ aus, aber die Hefegummireaktion war kräftig.

Tabelle 11. Ausbeute an Invertin bei der Abtrennung von Eiweiß.

Nr.	Menge Autol. ccm	Ang. S.E.	Zur Fällung verbr. $^{n}/_{1}$-Schwefelsäure ccm	Ideal filtr. Ausbeute nach Neutralisation		Wirkliche Ausbeute nach Neutralisation	
				S.E.	Proz. vom ang. Inv.	S.E.	Proz. vom ang. Inv.
1	50	0,326	6,25	0,323	99	—	..
2	531	4,10	56,2	3,90	95	3,49	77
3	4790	40,0	424	39,4	98	34,1	85
4	3980	33,2	291	31,2	94	26,7	81

[294] B. Vorreinigung durch Calciumphosphat-Alkohol-Fällung.

Die Fällung des Rohinvertins durch Alkohol ist auch bei dieser abgeänderten Isolierungsweise wichtig, da die von Eiweiß befreiten Autolysate alkohollösliche Stoffe enthalten, die auf die Kaolinadsorption sehr ungünstig einwirken. Aber in diesen Autolysaten zeigt das Invertin nach der Eiweißfällung große Empfindlichkeit gegen Alkohol, während es in der Eiweiß enthaltenden Flüssigkeit, wenn man nur die geeignete Acidität einstellt (Abschn. I, B), durch das Eiweiß geschützt wird. Der Hefegummi hat keine derartige Wirkung. Die Schwierigkeit läßt sich überwinden, indem man beim Fällen mit Alkohol das Invertin in die Form eines Adsorbates bringt, zweckmäßig mit tertiärem Calciumphosphat, dessen Anwendbarkeit für diese Adsorption schon in der I. Abh. (S. 84) erwähnt ist. Die Calcium- und Phosphationen der Lösung reichen an sich schon aus, um bei sorgfältigem Neutralisieren und Versetzen mit Alkohol das Invertin mindestens teilweise zu binden. Besser setzt man noch Calciumchlorid und Sekundärphosphat hinzu und fällt mit Alkohol, der die erforderliche Menge Ammoniak enthält. Dann gibt der Niederschlag auch beim Auswaschen kein Invertin ab, erst mit sehr verdünnter Essigsäure oder besser mit Mononatriumphosphat (I. Abh., S. 85) wird das Enzym vollkommen freigelegt.

Ein von Eiweiß getrenntes Autolysat, 3,7 l mit 24,8 E. versetzten wir zunächst mit 16 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ und 14,5 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; dann nahmen wir die Fällung

mit Alkohol in 3 Anteilen vor, wobei auf jeden 1,33 l Alkohol mit 6 ccm n/1-Ammoniak trafen. Die voluminöse Fällung enthielt alles Invertin. Es wurde abzentrifugiert, mit Wasser verrührt und vom Waschwasser getrennt, das 1,46 E. (6%) enthielt. Um zu eluieren, verrieben wir den Phosphatniederschlag mit 100 ccm 20proz. Mononatriumphosphat, verdünnten mit 1 l Wasser und ließen über Nacht stehen. Der Niederschlag wurde grobkrystallin, das Filtrat enthielt 19,7 E. Eine Probe von 2,7 E., zur Bestimmung des Reinheitsgrades dialysiert und elektrodialysiert, ergab mit einer Enzymeinbuße von 28% einen [295] S.W. 0,188 (Zeitwert 5,3). Die Verdünnung des Enzyms war hauptsächlich durch den Gehalt an Hefegummi bedingt; das Präparat gab auch noch die Ninhydrinreaktion stark.

C. Einmalige und wiederholte Adsorption durch Kaolin.

Für die Adsorption mit Kaolin sind die frischen Autolysate nach den beiden Reinigungsvornahmen geeignet. Der Adsorptionswert ist (Tab. 12) vom Wert 0,007

Tabelle 12.
Adsorption aus frischen Neutralautolysaten mit (salzsäurebehandeltem) Kaolin.

Nr.	Vorbehandlung, Versuchsbedingungen	Ads.-Grad	A.W.	El.-Ausbeute, Proz. vom ads. Inv.
1	ohne Vorbehandlung	14	0,007	—
2	enteiweißt	10	0,010	—
3	fraktion. Autol.; I. Fr. (38% d. Inv.), enteiweißt	10	0,010	—
4	fraktion. Autol.; Restfr.; enteiweißt	11	0,012	—
5	enteiweißt nach Phosphat-Alkohol-Fällung	80	0,240	58
6	enteiweißt; kurze Dialyse	36	0,036	—
7	„ nach 12 Tagen Dialyse	87	0,173	51
8	„ „ 17 „ „	75	0,190	54
9	dasselbe mit Glykokoll	69	0,171	—
10	„ „ Tyrosin	87	0,166	66
11	„ „ Phenylalanin	81	0,153	64
12	„ „ Leucylglycin	83	0,157	64
13	„ „ Leucylglycylglycin	78	0,150	66
14	„ „ Hefeeiweiß	44	0,10	81
15	„ „ „ , durch Papain abgebaut	35	0,066	—
16	„ „ Pepton ex Albumine	19	0,036	—
17	„ „ Albumin	keine Adsorption		—

des Autolysates auf 0,20 gestiegen. In der 50proz. alkoholischen Mutterlauge sind nämlich Eiweißspaltungsprodukte zurückgeblieben, welche die Adsorption des Invertins durch Kaolin beeinträchtigten. Sie sind dialysierbar. Daher wird auch einfach durch Dialyse des enteiweißten Autolysates eine günstige Kaolinadsorption [296] ermöglicht (Nr. 6 bis 8 der Tab. 12). Die Außenflüssigkeit des Dialysators enthielt starke Ninhydrinreaktion gebende Stoffe, durch deren Beimischung zu einer gut adsorbierbaren Invertinlösung der Adsorptionswert herabgedrückt wurde. Einige Aminosäuren und Polypeptide, die wir prüften (Nr. 9 bis 13), üben nur geringe Wirkung auf die Adsorption aus. Dagegen wurde diese durch Abbauprodukte des Hefeeiweiß, dargestellt durch Hydrolyse mit Papain, herabgedrückt, stärker als von dem nativen

Hefeprotein selbst, noch mehr von Pepton aus Albumin, am meisten von Albumin selber. In diesen Fällen war die Menge der Zusätze gleich dem Trockengewicht der Invertinlösung und die Konzentration der zugesetzten Stoffe 1:1000. Die adsorptionshemmenden Stoffe erhöhen die Beständigkeit des Invertins im Adsorbat, daher auch die Ausbeute in der Elution (von 54 auf 81 %, vgl. Nr. 8 mit Nr. 14 der Tabelle).

Die präparative Aufgabe der Kaolinadsorption nach den beiden Vorreinigungen ist hauptsächlich die Abtrennung des Hefegummis. Es scheint, daß infolge des geringen Gehaltes dieser Invertinlösungen an Eiweißspaltungsprodukten der Hefegummi zum Teil dem Invertin hartnäckiger anhaftet und ihm in die Adsorbate und Elutionen folgt. Am günstigsten ist es, die Adsorption bei großer Verdünnung und in möglichst saurer Lösung vorzunehmen. Wie die Tab. 13 erweist, ist bei sehr kurzer Versuchsdauer die Anwendung von $^{n}/_{2}$-Essigsäure mit einer Verdünnung von 1 E. in 2 l erträglich.

Tabelle 13.
Beständigkeit des Invertins im gereinigten Neutralautolysat gegen Säure.

Nr.	Acidität	Verd. 1 S.E. in ccm	Dauer der Einw. in Min.	Invertingehalt in S.E. vor der Einwirkung	Invertingehalt in S.E. nach der Einwirkung	Verlust in Proz. vom ang. Inv.
1	$^{n}/_{2}$-Essigsäure	2000	10	0,050	0,0495	1
2	$^{n}/_{2}$- ,,	2000	20	0,050	0,0465	6
3	$^{n}/_{4}$- ,,	5000	20	0,050	0,0485	3
4	$^{n}/_{2}$- ,,	5000	20	0,050	0,0428	14
5	$^{3}/_{4}$ n- ,,	5000	20	0,050	0,0290	42

[297] Einige Beispiele für die Adsorption unter diesen Bedingungen gibt die Tab. 14 wieder. Bei günstigen Adsorptionswerten sind die Enzymverluste an Kaolin, auch an salzsäurebehandeltem, bedeutend, der Reinigungseffekt, der sich im Saccharasewert ausdrückt, durch Zerstörung des Enzyms daher teilweise kompensiert. Die Saccharase ist schon arm an Schutzstoffen, der Hefegummi schützt wenig.

Tabelle 14. Einmalige Adsorption mit salzsäurebehandeltem Kaolin.

Nr.	Acidität	Verd. 1 E. in ccm	Ang. S.E.	Ads.-Grad	A.W.	Elutionsausbeute, Proz. vom ads. Inv.	Präparat S.W.
1	$^{n}/_{2}$-Essigsäure	300	0,150	59	0,147	62	—
2	$^{n}/_{10}$- ,,	2000	0,150	76	0,190	65	—
3	$^{n}/_{2}$- ,,	2000	0,150	80	0,24	37	—
4	$^{n}/_{4}$- ,,	5000	0,150	80	0,24	58	—
5	$^{n}/_{2}$- ,,	2000	4,00	96	0,23	43	0,91
6	$^{n}/_{4}$- ,,	5000	2,00	97	0,25	53	1,12

Die beiden Präparate Nr. 5 und 6 der Tab. 14 vom Saccharasewert 0,91 und 1,12 dürften nach den beobachteten Saccharaseverlusten Gehalte von mindestens 45 % an inaktiviertem Enzym haben. Die Inaktivierung am Kaolin war noch weitergehend, als wir natürliches Kaolin (ZETTLITZ) statt des salzsäurebehandelten anwandten. In den 2 Beispielen der Tab. 15 wurde das Invertin aus gereinigtem Autolysat durch zweimalige Adsorption mit unvorbehandeltem Kaolin bei raschester Versuchsausführung

(Charge von 4 bis 5 l, Verweilen des Invertins in Säure während höchstens 5 Min.) und Elution mit sehr verdünntem Ammoniak isoliert. Dabei ist es gelungen, den Gehalt an Hefegummi bis auf eine Spur herabzudrücken, während gleichzeitig die Ninhydrinreaktion ganz zum Verschwinden kam; die Millonprobe fiel negativ aus. Die enzymatische Wirksamkeit ist aber sehr ungünstig geworden: S.W. 0,16 und 0,21 (Zeitwert 6,20 und 4,74). Das zerstörte Invertin ist also vom aktiven nicht getrennt worden. Nach dem Maße der Enzymzerstörung am Kaolin (jedesmal $^2/_3$ bis $^3/_4$) [298] berechnet sich, daß die Präparate, wenn die Adsorptionen ohne Verlust vor sich gegangen wären, wahrscheinlich S.W. 3,33 und 4,0 (Zeitwert 0,30 und 0,25) gehabt hätten. Der Gehalt dieser beiden Präparate (1b und 2b) an Saccharase z. B. vom Zeitwert 0,2 wird daher ungefähr 80 und 67% betragen.

Während nach einer Kaolinreinigung die Präparate Nr. 5 und 6 der Tab. 14 noch einen geringen Tryptophangehalt aufwiesen, war das Präparat 1b der Tab. 15 von Tryptophan frei.

Tabelle 15.
Zweimalige Adsorption durch natürliches Kaolin. (Adsorption aus $^n/_2$-Essigsäure.)

Nr.	Verd. 1 S.E. in ccm	Ang. S.E.	Ads.-Grad	A.W.	Elutionsausbeute, Proz. vom ads. Inv.	Dial.-Verlust	Menge d. Präp., S.E.	S.W. des Präp.
1a	2000	4,00	98	0,255	32,5	—	—	–
b	5000	1,17	95	0,236	21,4	0	0,227	0,21
2a	2000	9,70	98	0,245	22,2	—	—	– –
b	5000	2,12	70	0,149	37,3	21	0,435	0,16

III. Invertin aus gealterten Autolysaten.

(Tryptophanhaltiges und tryptophanfreies Invertin.)

Zum Vergleich mit den neuen Invertinpräparaten aus sehr rasch bereiteten, frischen Hefeauszügen sollen einige Darstellungen aus lange gealterten Autolysaten herangezogen werden.

A. Ein Präparat von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE war durch Vorreinigung mit Kaolin in acetonhaltiger Lösung und durch aufeinanderfolgende Adsorption mit Tonerde und Kaolin gereinigt. Von den in der I. Abh. beschriebenen analogen Präparaten unterschied es sich dadurch, daß die Vorbehandlung mit Kaolin in Aceton weitergehend war. Sie hat 48 Stunden gedauert und zur Abnahme des Invertingehalts der Lösung um 37% geführt. Diese Abänderung des Verfahrens war in doppelter Beziehung von großem Einfluß. Das Präparat war viel weniger beständig als andere. Jede der sonst mit guter Ausbeute verlaufenden Vornahmen war in diesem Falle mit [299] großem Verlust verbunden, z. B. betrug bei der Elution aus dem Kaolin die Ausbeute nur 20%. Infolgedessen besaß das Enzym nach der Dialyse und dem Abdampfen zur Trockne beim Wiederauflösen nur den Zeitwert 5,3. Es läßt sich nach den genauen Aufzeichnungen schätzen, daß ohne die ungewöhnlichen Verluste durch Inaktivierung ein normaler Zeitwert von 0,7 gefunden worden wäre. Die länger

dauernde Behandlung mit Kaolin hatte eine Verarmung an schützenden Begleitstoffen zur Folge. Wie sonst bei der Adsorption durch Kaolin der tryptophanhaltige Begleitstoff in das Adsorbat übergeht, so ist er in diesem Falle durch die Voradsorption entfernt worden. Das Präparat enthält kein Tryptophan. Es gibt auch keine Millonreaktion; es ist in der Tat eiweißfrei.

B. Ein Präparat von R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN (Abh. III, Tab. 7, Präp. n_1; Zeitwert 0,636) war durch vollständige Ausfällung mit Bleiacetat, Tonerdeadsorption aus der Elution und durch wiederholte Fraktionierung mit Hilfe von Bleiacetat gewonnen. Entscheidend für die Natur des Präparats ist, daß es aus gealtertem Neutralautolysat stammt, also aus anfangs eiweißreichem, proteolytisch stark abgebautem Material. Es scheint, daß das Enzym sehr viel Eiweißspaltungsprodukte mitführte, und daß keine wirksame Fraktionierung erreicht wurde. Das Präparat gibt schwache Millonprobe und ist tryptophanreich.

C. Die Vorgeschichte, Isolierung aus gealtertem Neutralautolysat, war auch für ein weiteres Präparat, ein tryptophanreiches, bestimmend. Es war durch Alkoholfällung vorgereinigt, dann durch Kaolinadsorption und zweimalige Adsorption an Tonerde gereinigt worden. Die erreichten Adsorptionswerte des Aluminiumhydroxyds in $^n/_{1000}$-essigsaurer Lösung waren 72 beim ersten, 135 beim zweiten Male. Schließlich trat bei viertägiger Dialyse eine Aktivitätsabnahme um 20% ein; der S.W. betrug daher nur 3,57 (Zeitwert 0,28).

D. Ein nach dem Verfahren der V. Abh., Abschn. D, S. 215, aus gealtertem, saurem Autolysat ohne Vorreinigung durch Kaolin-, dann durch Tonerdeadsorption bei sehr großer Verdünnung gewonnenes Präparat vom S.W. 2,70 (Zeitwert 0,37) [300] gab starke Millonreaktion und enthielt ziemlich viel Tryptophan (3,7%).

E. Ein genau gleichartiges Präparat ist unter dankenswerter Mitwirkung des Herrn Dr. W. WASSERMANN mit Bleiacetat zu gutem Saccharasewert (4,16 bzw. 4,35,

Tabelle 16.
Reinigung von Invertin aus gealtertem, saurem Autolysat mit Bleiacetat.

21 l 10 Monate altes Autolysat mit 88,4 E.
Ads. m. 87,5 g Kaolin, el. mit Amm.: 73,7 E.
Ads. 66 E. durch 3,8 g Tonerde B; el. m. Amm.: 48,8 E.
Mit 1 g Bleiacetat gefällt; Fällung verworfen.
Restlösung mit H_2S entbleit.

↓ Filtrat vom PbS 17,7 E.; S.W. 4,16. Mit bas. Bleiacetat gefällt.

↓ PbS-Ndschl. m. Phosph. u. Amm. el. 7,61 E. Nach Dial. unter Einbuße. S.W. 4,16, Präp. α.

↓ (aus dem Filtrat) Restlös. 2,1 E. Mit Einbuße der halben Wirksamkeit dial. u. el. dial. S.W. 2,23, Präp. γ.

↓ (aus dem Filtrat) Fällung m. Phosph. u. Amm. el. 10,8 E. Nach Dial. m. Verl. S.W. 4,35, Präp. β.

in allen Proben nach Eindampfen und Dialyse direkt bestimmt) weiter gereinigt worden. Es ist in diesem Falle gelungen, das nach der Tonerdeadsorption noch beigemischte Tryptophanderivat vollständig zu beseitigen. Zugleich schwächte sich die Millonreaktion ab. Das Verfahren ist in der Tab. 16 dargestellt. Beim erstmaligen Fällen mit Bleiacetat wurde der Niederschlag verworfen, die Restlösung (nach Adsorption an Bleisulfid und Elution Präp. α) wurde abermals und zwar mit Bleiessig gefällt und vergleichsweise die neue Restlösung (Präp. γ) sowie die Elution aus der Bleifällung (Präp. β) untersucht.

IV. Tryptophangehalt und Stickstoffgehalt der Invertinpräparate.

In der fünften Arbeit wurde Invertin nach dem Grade der Millonreaktion fraktioniert. Der Vergleich der Präparate [301] ergab, daß einige die Millonreaktion so stark wie Hühnereiweiß, andere 100- bis 200mal schwächer und andere gar nicht zeigen. Zu demselben Unterschiede führt nun der Vergleich der Tryptophangehalte.

H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] haben vor kurzem die wichtige Angabe veröffentlicht, daß die Saccharase sich durch einen auffallend hohen Gehalt an Tryptophan auszeichne. Fünf Stockholmer Präparate des Enzyms von If 225 bis 245 (Zeitwert 0,27 bis 0,24) enthalten annähernd übereinstimmend 4,93 bis 5,58 % Tryptophan. Unsere Präparate, deren Analyse wir im folgenden verzeichnen, sind nun mit der Absicht verglichen und zum Teil schon mit der Absicht dargestellt, das Wesentliche und das Nebensächliche der Zusammensetzung an Präparaten von ungleicher Vorgeschichte zu unterscheiden.

Ohne die Frage zu prüfen, ob die zur Bestimmung angewandte Farbreaktion ausschließlich vom Tryptophan bedingt wird, sind wir, um einen genauen Vergleich mit den Ergebnissen unserer Stockholmer Kollegen zu ermöglichen, genau der von ihnen angewandten Methode gefolgt. Der Tryptophangehalt wurde also unter Anwendung von reinem Tryptophan als Vergleichsmaterial nach der von O. v. FÜRTH und E. NOBEL[2] und O. v. FÜRTH und F. LIEBEN[3] quantitativ ausgearbeiteten[4] Reaktion von E. VOISENET[5] (mit Formaldehyd, Nitrit und Salzsäure) im Colorimeter von K. BÜRKER[6] bestimmt. Die Zahlen sind in der Tabelle 17 zusammen mit den Stickstoffgehalten (vgl. Tab. 18) der wichtigsten Präparate verzeichnet.

Die Präparate der vollkommensten Reinigung mittels der Tonerdeadsorption (Nr. 2, 3 und 5 der Tab. 17) erreichen bei Zeitwerten von 0,15 bis 0,23 die höchsten Tryptophangehalte, nämlich 8,8 bis 9,4 %. Präparate aus den nämlichen Autolysaten,

[1] Chem. Ber. Bd. 57, S. 859 [1924]. [2] Biochem. Zs. Bd. 109, S. 103 [1920].
[3] Biochem. Zs. Bd. 109, S. 124 [1920].
[4] Vgl. auch O. v. FÜRTH udn Z. DISCHE, Biochem. Zs. Bd. 146, S. 275 [1924].
[5] Bull. Soc. Chim. Bd. 33, S. 1198 [1905].
[6] Pflügers Arch. f. ges. Physiol. Bd. 203, S. 274 [1924].

[302] Tabelle 17. Tryptophan- und Stickstoffgehalte einiger Invertinpräparate.

Nr.	Präparat, Zitat	Reinheitsgrad Z.W.	S.W.	If	Stickstoffgehalt Proz.	Tryptophanbestimmung Ang. Menge mg	Vergleichslösung	Colorimeterstellung	Tryptophangehalt Proz.
1	Tab. 8 Präp. B . .	0,73(0,29)	1,37(3,45)	83(210)	5,11	—	—	—	—
2	„ 8 „ C . .	0,21	4,75	289	10,35	13,56	0,06 proz. Trypt.	10,0	8,8
3	„ 8 „ C . .	0,23(0,20)	4,35(5,00)	264(304)	10,60	5,76	0,03 „ „	11,1	9,4
4	„ 8 „ D . .	0,41(0,32)	2,45(3,13)	149(190)	6,40	9,28	0,03 „ „	11,4	5,8
5	„ 8 „ D . .	0,15	6,67	406	9,21	4,56	0,03 „ „	14,8	8,9
6	Präp. Abschn. III C	0,28	3,57	217	8,10	10,55	0,06 „ „	13,7	9,2
7	„ „ III B	0,636	1,58	96	—	41,19	0,15 „ „	14,2	5,1
8	„ „ III D	0,37	2,70	164	—	7,61	0,01 „ „	15,5	3,7
9	„ „ III A	5,3 (0,7)	0,19(1,43)	11,5(87)	—	38,15	negativ		0
10	Tab. 16 Präp. α . .	0,24	4,16	253	4,83	5,56	„		0
11	„ 16 „ β . .	0,23	4,35	264	—	4,43	„		0
12	„ 16 „ γ . .	0,45	2,23	135	—	7,38	„		0
13	„ 14 Nr. 5 . . .	1,10	0,91	55	—	13,83	0,007 proz. Trypt.	10,9	0,9
14	„ 14 „ 6 . . .	0,89	1,12	68	—	11,87	{ >0,005 proz. Trypt. <0,01 proz. Trypt. }	—	ungef. 0,4
15	„ 15 „ 1b . .	4,74(0,25)	0,21(4,0)	12,8(243)	6,55	6,88	negativ		0

[303] Tabelle 18. Stickstoffbestimmungen einiger Invertinpräparate.

Nr.	Präparat, Zitat	S.W.	If	Substanz mg	Stickstoff-vol. ccm (korr.)	Temp. t° C.	Druck mm	Stickstoff Proz.	If / Proz. Stickstoff
1	Tab. 8 Präp. B . .	1,37 (3,45)	83 (210)	3,700	0,176	23	708	5,11	16,2 (41,2)
2	„ 8 „ C . .	4,75	289	4,935	0,475	23	708	10,35	27,8
3	„ 8 „ C . .	4,35 (5,00)	264 (304)	3,995	0,396	23	707	10,60	25,0 (28,7)
4	„ 8 „ D . .	2,45 (3,13)	149 (190)	3,600	0,215	23	707	6,40	23,3 (29,8)
5	„ 8 „ D . .	6,67	406	2,300	0,193	22	721	9,21	44,1
6	Präp. Abschn. III, C	3,57	217	7,130	0,529	23	719	8,10	26,8
7	Tab. 16 Präp. α . .	4,16	253	4,305	0,191	23	718	4,83	52,7
8	„ 15 Nr. 1b . .	0,21 (4,0)	12,8 (243)	3,290	0,200	22	709	6,55	—

Tabelle 19.
Saccharasewirksamkeit und Stickstoffgehalte einiger Invertinpräparate.

Nr.	Präparat, Zitat	S.W.	If	Verluste bei den versch. Operationen in Proz. K = Kaolin-, A = Alum.-Ads., D = Dialyse	Proz. Stickstoff	If / Proz. Stickstoff
1	Abh. V, Tab. 12 Präp. m_1	(5,5)	(335)	D : 80	5,65	(59,5)
2	„ V, „ 12 „ m_2	6,14	375	D : 10	9,53	39,3
3	Tab. 8, Präp. D	6,67	406	K : 20, D : 8, D : 21, A : < 25, A : < 12	9,21	44,3
4	„ 16 „ α	4,16	251	K : 15, A : < 24 (unvollst. el.)	4,83	52,7
5	„ 8 „ C	4,75	289	K : 13, D : 8, A : < 24	10,35	27,8

[304] die abweichend von der ersten Gruppe unter möglichst frühzeitiger Abtrennung der Hefeproteine gewonnen wurden und sich durch Unbeständigkeit am Kaolin auszeichneten, daher auch nicht zu hohen Aktivitätswerten gebracht wurden, haben weniger als 1 % Tryptophan (Nr. 13 und 14 der Tab. 17), nach wiederholter Kaolinadsorption gar keines mehr (Nr. 15 der Tab. 17).

Entscheidend sind endlich Präparate aus gealterten Autolysaten. Ein Präparat von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE (Nr. 9 der Tab. 17) ist frei von Tryptophan und gibt keine Millonreaktion. Es stammt von den Versuchen, die zu der Schlußfolgerung geführt hatten, daß Invertin eiweißfrei erhalten worden ist. Ein Präparat, durch Kaolin und Tonerde nach der einfachsten bei uns üblichen Methode (Adsorption aus sehr verdünnter Lösung) gereinigt, weist 3,7% Tryptophan auf (Nr. 8 der Tab. 17). Schließt sich eine weitere Reinigung mit Bleiacetat an (Nr. 10, 11 und 12 der Tab. 17), bei der die Aktivität erhalten blieb, so wurde dabei das gesamte Tryptophan abgetrennt.

Was die Stickstoffgehalte betrifft[1], so hatten die Bestimmungen verschiedener Invertinpräparate in der V. Abhandlung, die bei Zeitwerten von 0,25 bis 0,37 zwischen 10,24 und 5,41 schwankten, zu der Schlußfolgerung geführt: „Die von H. v. EULER und K. JOSEPHSON aufgeworfene Frage, ob zwischen dem Stickstoffgehalt und der Inversionsfähigkeit Proportionalität besteht, ist zu verneinen." Gegen diese Kritik hat K. JOSEPHSON[2] einen durchaus berechtigten[3] Einwand erhoben. Wenn die analysierten Invertinpräparate in sehr verschiedenem Maße Inaktivierung erlitten haben, so bekommen die nach H. v. EULER und K. JOSEPHSON berechneten [305] Quotienten $\frac{\text{If}}{\text{Proz. Stickstoff}}$ Ausschläge. Allein es läßt sich schon an dem Material der V. Abhandlung, noch einfacher und deutlicher an den in der Tab. 19 (S. 303) angeführten Präparaten dartun, daß eine Proportionalität zwischen Saccharasewirksamkeit und Stickstoffgehalt wirklich gar nicht besteht.

Vergleichen wir die Präparate C und D des Abschnitts I; das erstere hat größere, das letztere kleinere Aktivitätsabnahme im Laufe der Reinigung erlitten. Dennoch beträgt der Quotient $\frac{\text{If}}{\text{Stickstoffgehalt}}$ bei C 27,8 und bei D 44,0. Wären die Präparate unter gleichen Aktivitätsverlusten gereinigt, so würde der Quotient noch viel mehr differieren. Das Präparat α der Tab. 16, das ähnliche Aktivitätseinbußen wie C gehabt hat, ergibt den Quotienten 52,8, also fast das Doppelte wie C.

Die gefundenen Stickstoffgehalte der Invertinpräparate von den Reinheitsgraden S.W. 6,67 bis 4,0 sind durch willkürliche und wechselnde Assoziationen mit Stickstoff enthaltenden Fremdstoffen beeinflußt.

[1] Siehe dazu H. v. EULER und K. JOSEPHSON, Chem. Ber. Bd. 56, S. 446 u. 1097 [1923]; Bd. 57, S. 299 u. 859 [1924].

[2] Diese Zs. Bd. 136, S. 224 [1924].

[3] In den Einzelheiten der Berechnung stimmen wir mit K. JOSEPHSON nicht überein. Die Verluste bei der Elution aus Tonerdeadsorbat beispielsweise beruhen gewiß nicht auf Enzymzerstörung, sondern es sind Anteile des Enzyms in den Adsorbaten zurückgelassen worden.

Zeitschrift für physiologische Chemie **146**, S. 158 [1925].

54. INVERTINANREICHERUNG IN DER HEFE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER, CHARLES D. LOWRY JR. und KARL SCHNEIDER.

Neunte Abhandlung zur Kenntnis des Invertins.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 6. Mai 1925.)

Theoretischer Teil.

Planmäßige Untersuchungen über „Saccharasegehalt und Saccharasebildung in der Hefe" sind von H. v. EULER[1] und seinen Mitarbeitern seit dem Jahre 1910 ausgeführt worden. Sie fanden Ergänzung durch Arbeiten, die J. MEISENHEIMER, ST. GAMBARJAN und L. SEMPER[2] für präparative Zwecke in größerem Maßstabe unternahmen. In diesen Untersuchungen ist es gelungen, den Enzymgehalt der Hefe durch Führung bei der optimalen Gärtemperatur von 27° und bei Anwesenheit von Phosphor- und Stickstoffverbindungen ansehnlich zu steigern. **[159]** Die Methode war intensive Gärung in starker Zuckerlösung, tagelang dauernd und mehrere Male wiederholt. Den Stand der Methode gibt wohl am besten eine soeben von O. SVANBERG[1)] veröffentlichte Monographie wieder mit folgendem „Schema der Vorbehandlung der Hefe":

1. Tag	100 l (etwa 15proz.) Stammwürze . . .	10 kg Zucker,	28°
2. „	0,75 kg Ammonphosphat	15 „ „	28°
3. „	0,75 „ „	15 „ „	26°
4. „	0,5 „ „	10 „ „	25°

und mit dem Ergebnis, daß der Invertinzeitwert der Brauereihefe vor dieser viertägigen Behandlung 400 und am Ende 90 betrug. Um genauer die günstigsten Leistungen

---

[1] H. v. EULER und B. AF UGGLAS, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 3, Nr. 34 [1910] und Diese Zs. Bd. 70, S. 279 [1910/11]; H. v. EULER und D. JOHANSSON, Diese Zs. Bd. 76, S. 388 [1912]; Bd. 78, S. 246 [1912]; Bd. 84, S. 97 [1913]; H. v. EULER und H. MEYER, Diese Zs. Bd. 79, S. 274 [1912]; H. v. EULER und H. CRAMER, Diese Zs. Bd. 88, S. 430 [1914]; Bd. 89, S. 272 [1914]; Biochem. Zs. Bd. 58, S. 467 [1914]; Bd. 67, S. 203 [1914]; H. v. EULER und E. LÖWENHAMM, Diese Zs. Bd. 97, S. 286 [1916]; H. v. EULER, Biochem. Zs. Bd. 85, S. 406 [1917/18]; H. v. EULER und O. SVANBERG, Diese Zs. Bd. 106, S. 201 [1919]; Bd. 107, S. 269 [1919]; O. SVANBERG, Diese Zs. Bd. 109, S. 65 [1920].

[2] Biochem. Zs. Bd. 54, S. 122 [1913] und Bd. 67, S. 364 [1914].

[1)] In Abderhaldens „Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden", Abt. IV, Teil 1, Heft 2 (Lieferung 134, 1925), und zwar S. 251.

anzuführen, die mit der Methode der Gärung bei hoher Zuckerkonzentration in den Händen der früheren Autoren erzielt wurden, bedarf es für die Angaben des EULERschen Laboratoriums und für diejenigen von MEISENHEIMER je eines Schlüssels, um die Werte in vergleichbare Form zu bringen.

Aus den von MEISENHEIMER angeführten Werten für die Reaktionskonstante K der Rohrzuckerhydrolyse und den Hefetrockengewichten lassen sich die Zeitwerte ableiten nach der Gleichung:

$$\text{Zeitwert} = \frac{0{,}619}{K \times 0{,}57} \times \frac{5}{6} \times \frac{\text{Proz. Trockengew.} \times 0{,}2}{0{,}05 \times 100}.$$

Der Rechnung ist nicht der gefundene Mittelwert von K zugrunde gelegt, sondern der durch Extrapolation oder Interpolation für 75,93 % Spaltung ($\alpha_D = \pm 0°$) zu ermittelnde Wert für K. Die Extrapolation ist nicht in allen Fällen möglich, nämlich in den Fällen nicht, wo K aus zu geringem Spaltungsgrade abgeleitet wurde, also bei den Zeitwertberechnungen der invertinarmen Ausgangshefen. In solchen Fällen berechnen wir K für die Umwertung in Zeitwert aus dem angegebenen Spaltungsgrad mittels der experimentell gefundenen Kurve des Reaktionsverlaufs. Die Zahlen bedeuten aber dann nur Annäherungswerte.

Um aus den von H. v. EULER und seinen Mitarbeitern verzeichneten Beobachtungen über Invertinzuwachs auf die Invertingehalte der Hefen (If oder Invertinzeitwert bzw. Saccharasewert) zu schließen, wären Angaben über die Hefentrockengewichte nötig, die aber leider fehlen. Nur unter der Annahme, daß die von H. v. EULER und O. SVANBERG[1] einmal angegebene Zellenzahl $0{,}16 \times 10^{11}$ von 1 g getrockneter Hefe [160] einen Durchschnittswert darstellt, könnte man aus Inv. den Zeitwert ableiten mit der Brücke:

$$\text{If} = \frac{K \times \text{g Zucker}}{\text{g Trockenhefe}} = \frac{K \times \text{g Zucker} \times 0{,}16 \times 10^{11}}{\text{Zellenzahl}} = \text{Inv.} \times 0{,}16 \times 10^{11}$$

also

$$\text{Zeitwert} = \frac{60{,}8}{\text{Inv.} \times 0{,}16 \times 10^{11}}.$$

Danach ergibt sich für Inv. $= 10 \times 10^{-12}$ der Zeitwert 380. Da aber die Zellenzahl für 1 g Trockenhefe nur in dem einen Falle angegeben ist, so handelt es sich bei der Umrechnung der Eulerschen Zahlen in Zeitwerte nur um Schätzungen.

Tabelle 1.
Invertinzunahme ber. nach Vers. von H. v. EULER und von J. MEISENHEIMER.

Nr.	Zeitw. Ausgangshefe	Menge	Vorbehandlung bei 25—28°	Erzielter Zeitwert	Zitat
1	480	5 g	3mal je 1 Tag in 500 ccm Nährlös. m. 20 g Fructose	42	Biochem. Zs. Bd. 54, Tab. S. 147
2	480	5 g	3mal je 1 Tag in 500 ccm Nährlös. m. 20 g Invertz.	47	Biochem. Zs. Bd. 54, Tab. S. 147
3	280	400 g	40 Stunden in 30 l Nährlös. m. 600 g Saccharose	72	Biochem. Zs. Bd. 54, Tab. S. 153
4	440	5 g	5mal je 2 Tage in 50 ccm Bierwürze	58	Biochem. Zs. Bd. 67, Tab. S. 374
5	650	5 g	4mal je 1 Tag in 500 ccm Bierwürze und 2mal je 1 Tag in 500 ccm 2proz. Fructoselösung	57	Biochem. Zs. Bd. 67, Tab. S. 378
6	520	20 kg	Siehe Schema im Text	94	Diese Zs. Bd. 109, S. 66 bis 69
7	380		Ähnlich Nr. 6	120	Diese Zs. Bd. 107, S. 295
8	500	1 g	24 Stunden m. 100 ccm Saccharoselös. u. Nährsalzen 48 Stunden m. 100 ccm Saccharoselös. u. Nährsalzen 24 Stunden ohne Zusatz	78	Diese Zs. Bd. 106, S. 232.

[1] Diese Zs. Bd. 106, S. 201 [1919], und zwar S. 207.

[161] Gemäß den auf solche Weise umgerechneten bisherigen Beobachtungen, welche die Tab. 1 verzeichnet, ist der Invertingehalt der Bierhefe, für den wir durchschnittlich einen Zeitwert 330 finden, durch die intensive Gärführung nach H. v. EULER und nach J. MEISENHEIMER zu Zeitwerten von 120 bis 42 gesteigert. Derart war das Ausgangsmaterial für die Invertinpräparate von MEISENHEIMER und besonders für die des Stockholmer Laboratoriums. In unseren Arbeiten über Invertin ist bis vor kurzem von dieser aussichtsreichen Methode kein Gebrauch gemacht worden, weil uns auch nach dem Ende des Krieges Zucker jahrelang nicht verfügbar war. Die Minderwertigkeit des Ausgangsmaterials, auf das wir uns bei den präparativen Versuchen angewiesen sahen, war der Ausbildung der Verfahren zur Isolierung der Enzyme förderlich. Nachdem nun die Adsorptionsmethode in der Anwendung zur Invertindarstellung zu einem gewissen Abschluß gediehen, erschien es wertvoll, enzymreiches Ausgangsmaterial zu verarbeiten, um die ausgebildeten Methoden an den geeignetsten Hefen und Autolysaten zu erproben und weiter zu entwickeln. Auf diesem Wege waren Vereinfachungen der Methoden zu erwarten. Ein hauptsächliches Ziel dieser Untersuchung ist die Anreicherung der Saccharase im Verhältnis zu den ihr am nächsten stehenden Stoffen, z. B. den begleitenden Enzymen, die am schwersten abzutrennen sein werden.

Einen noch zu wenig beachteten Umstand fanden wir für die Invertinanreicherung in der Hefe wichtig. Sie ist von dem physiologischen Zustand, von der spezifischen Energie des lebenden Pilzes abhängig und zwar so, daß Hefe, die in der Brauerei eine größere Zahl von Gärungen durchgemacht hat, schlechter zur Enzymbildung taugt als Hefe nach nur wenigen Gärführungen. Während einer Anzahl von Gärungen im Brauereibetrieb erfolgt, trotzdem diese bei sehr niedriger Temperatur langsam verlaufen, Degeneration der Hefe, derentwegen sie in der Brauerei aus dem Betrieb ausgeschaltet wird. Übrigens verschlechtert sich auch im Laufe der Gärungen der Invertinzeitwert der Hefe, den wir bei einem Teilstamm von 148 (Zeitwert im Zustand der Reinzuchtführung) bis 290 [162] (nach 7 Gärungen in der Brauerei) verfolgt haben. Diese Beobachtung muß neben der Erfahrung von H. v. EULER erwähnt werden, der mit seinen Mitarbeitern die Inversionsfähigkeit einer Stockholmer Unterhefe *II* 12 Jahre lang verfolgt und eine sehr bemerkenswerte Konstanz

$$\text{If} = 15 \times 10^{-2}, \text{ d. i. Zeitwert } 405$$

festgestellt hat[1]. „Keinesfalls dürfte man früher vorausgesetzt haben, daß sich ein ‚normaler' Enzymgehalt eines Stammes von Mikroorganismen mit solcher Genauigkeit angeben läßt." Dazu bemerkt H. v. EULER einschränkend: „Es muß hier hervorgehoben werden, daß von der Konstanz einer Enzymwirkung in lebenden Zellen von Mikroorganismen nur insofern gesprochen werden kann, als diese Zellen die gleiche oder annähernd gleiche Vorgeschichte besitzen, besonders unter vergleichbaren Kulturbedingungen, Zusammensetzung der Nährlösung, Temperatur, Acidität gewachsen sind."

[1] H. v. EULER, „Chemie der Enzyme", I. Teil, III. Aufl., München 1925, S. 401.

Der für die günstigste Invertinbildung in der Hefe entscheidende Umstand ist die Art und Weise der Gärführung. Die bisher beobachtete Enzymvermehrung wird weit überholt, wenn man, statt die Hefe in starker Zuckerlösung zu führen, eine Gärführung mit minimaler Zuckerkonzentration anwendet. Wenn auch

Tabelle 2.
Invertinvermehrung bei Gärführung mit geringster Zuckerkonzentration.

Nr.	Zeitwert der Ausgangshefe	Erreichte Zeitwerte während der Gärführung: Zwischenbestimmung		Invertin-vermehrung
		Zwischenbestimmung	Endwert	
1	148	3 Stunden 40% Zucker 36	17,5	8,5 fach
2	165	3 „ 30 „ „ 42	15	11 „
3	216	3½ „ 45 „ „ 41	18	12 „
4	278	3 „ 40 „ „ 41	19	14,7 „
5	290	1½ „ 20 „ „ 56	21	13,8 „

der lebende Pilz je nach seinem spezifischen Energiezustand sich von Fall zu Fall etwas [163] verschieden verhält, so ist das neue Verfahren doch gut reproduzierbar. In 2 bis 3 Stunden mit 20 bis 30% Zucker werden die bis vor kurzem besten Zeitwerte erreicht, in einem Tag die Endwerte des Invertingehaltes, nämlich Zeitwerte zwischen 15 und 22, also 16fach bessere als bei unserem bisherigen Ausgangsmaterial. Einige Beispiele sind in der voranstehenden Übersicht angeführt.

Merkwürdige Aufschlüsse über die Enzymbildung in der Hefe gewährt uns der Vergleich zwischen dem Anwachsen des Invertingehaltes und der Änderung anderer, der Messung zugänglicher enzymatischer Leistungen. Es war aus den Untersuchungen von H. v. Euler, D. Johansson und O. Svanberg schon bekannt, daß mit dem Invertinzuwachs keine Zunahme an Gärkraft einhergeht. Auch in unsern Versuchen blieb das Gärvermögen bei höherem Anwachsen des Invertingehalts unverändert. Aber auch die einfachen Hefeenzyme machen die Anreicherung der Saccharase nicht mit. Wir finden die Maltase (α-Glucosidase) nur um ein geringes vermehrt, β-Glucosidase am Ende des Versuchs, wie zu Beginn, fehlend, die proteolytischen Enzyme, abweichend von den Folgerungen, die H. v. Euler und K. G. Dernby[1] aus der Geschwindigkeit der Hefeautolyse zogen, so gut wie unverändert. Das Verhältnis der Saccharase zu den sie begleitenden Enzymen wird also fast in dem Maße ihrer Anreicherung verbessert.

Die spezifische Zunahme der Saccharase und ihre Abhängigkeit von der möglichst geringen Zuckerzufuhr bei der Gärführung liefert Anhaltspunkte hinsichtlich des Vorgangs der Enzymbildung in der gärenden Hefe.

Das neubearbeitete Handbuch „Die Fermente und ihre Wirkungen" von C. Oppenheimer schreibt[2] über diese Frage: „Wie aus den Arbeiten von Fernbach und besonders den modernen Arbeiten von Euler und Meisenheimer hervorgeht, ist die Produktion der normalen Fermente im ganzen überhaupt vom Ernährungszustande abhängig. Werden die Zellen gut ernährt, so bilden sie auch kräftige Fermente." Die Erfahrungen mit der Brauereihefe widersprechen dieser Ansicht. [164] Das Handbuch führt ferner aus einer älteren Eulerschen Arbeit an[3]): „Durch Züchtung auf stickstoffhaltiger (Lindnerscher) Nährlösung wird nicht nur die Invertasebildung gesteigert, sondern alle vitalen Prozesse." Die selektive Zunahme der Saccharase steht damit nicht in Ein-

[1] Diese Zs. Bd. 89, S. 408 [1914], und zwar S. 416. [2] S. 420. [3]) S. 548.

klang. In einer neueren Untersuchung kommt H. v. EULER indessen zu der Auffassung[2], „daß es sich hierbei um eine Synthese handelt, zu welcher die durch die Gärung zu liefernde Energie ebenso notwendig ist, wie überhaupt zur Bildung von Protoplasma in Hefezellen". Außer der Beziehung zur Gärungsenergie, die gewiß keine einfache ist, sucht H. v. EULER einen Zusammenhang der Invertinbildung mit dem Wachstumsvorgang auf[3]. „Dabei hat sich gezeigt, daß diese Vermehrung des Enzymgehalts mit der Wachstumsfähigkeit der Zelle zusammenhängt, indem die Zellen ihren normalen Saccharasegehalt nur während der Periode der Vermehrung überschreiten." Eine Einschränkung dieser Betrachtung dürfte aber in folgender Darstellung von H. v. EULER[4] liegen: „Daß die Enzymbildung mit dem Wachstum keineswegs parallel zu gehen braucht, zeigten die Versuche von CRAMER und PALM. So verläuft nach CRAMERS Versuchen die Invertasebildung in einer lactosehaltigen Nährlösung, in der nur sehr geringes Wachstum stattfindet, quantitativ ebenso, wie in einer Glucoselösung, in der sich die Zellen normal vermehren. Andererseits kommt, wie JOHANSSON und PALM festgestellt haben, nicht selten Wachstum ohne Enzymbildung vor."

Die Hefe bildet Invertin am schnellsten und reichlichsten, wenn sie, geeigneten physiologischen Zustand vorausgesetzt, irgend einen Zucker bei minimaler Konzentration vergärt. Die Enzymbildung ist in überraschendem Maße selektiv. Es liegt also nicht einfach erhöhte Vitalität vor. Durch die Darbietung gärbaren Zuckers wird auf die Hefe ein Reiz ausgeübt, sie scheint dadurch in einen Zustand der Gärbereitschaft versetzt zu werden. In diesem Zustand empfängt sie dauernd eine im Vergleich zu den üblichen Gärbedingungen nur geringe Menge von Zuckermolekülen. Unter den Bedingungen unserer Methode treten in eine Hefezelle in der Sekunde etwa $1,3 \times 10^7$ Moleküle Rohrzucker ein, um vergoren zu werden, während unter den Bedingungen der Gärführung nach H. v. EULER (Tab. 1, Nr. 8) der einzelnen Hefezelle $1,0 \times 10^{12}$ Zuckermoleküle dargeboten werden.

[165] Da bei geringer Zuckerzufuhr mehr Invertin neugebildet wird als bei reichlicher, so scheint es der Erregungszustand bei der limitierten Gärung zu sein, welcher der Enzymneubildung zugute kommt. Eine ebenso rätselhafte wie wichtige Erscheinung ist die Vereinzelung, mit der die Hefe eben die Saccharase vermehrt. Diese nimmt im enzymatischen Apparat des Pilzes eine Ausnahmestellung ein.

Invertinbildung während der Autolyse.

Das von der quantitativen Bestimmung angezeigte Invertin in der geführten Hefe ist wirklich vorhandene Enzymmenge. Es gelingt mit geeigneten Verfahren der Autolyse das nachgewiesene Invertin in einer Ausbeute von 90 bis 100 % in einem Tage oder sogar in einem halben zu isolieren. In unserer ersten Arbeit über Invertin waren wir der merkwürdigen Erscheinung begegnet[1]), daß die Ausbeute an Invertin oft größer ist als der Invertingehalt der Hefe. Sie betrug in manchen Fällen 130 bis 205 %. Der Enzymzuwachs trat namentlich ein bei Autolyse unter Zusatz von Ammonphosphat. Auch bei der Isolierung von Maltase[2]) wurde eine derartige Zunahme

[2] Biochem. Zs. Bd. 85, S. 406 [1917], und zwar S. 407.
[3] Chem. Ber. Bd. 55, S. 3583 [1922], und zwar S. 3596.
[4] Biochem. Zs. Bd. 85, S. 407 [1917], und zwar S. 408 bis 409.
[1]) R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, I. Abh. Zur Kenntnis des Invertins, Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar z. B. S. 35, 46 u. 47.
[2]) R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 111, S. 157 [1920], und zwar S. 169; Bd. 115, S. 199 [1921], und zwar S. 204 u. 210.

beobachtet; die Ausbeuten waren „mitunter über die Menge in der Hefe weit hinausgehend". Bei der Bestimmung von Maltase in maltasearmen Hefen mußte wegen der langen Bestimmungsdauer der Enzymzuwachs berücksichtigt werden: „In solchen Fällen werden für eine solche Hefe zwei Zeitwerte verzeichnet: ein durch Extrapolieren für den Zeitpunkt des Bestimmungsanfangs abgeleiteter und ein für das Ende der Bestimmungsdauer gefundener", z. B. 230 und 125.

Auf diese Erscheinung fällt nun Licht durch die Erfahrungen über Gärung mit minimaler Zuckerkonzentration. Die Bedingungen solcher Gärung sind bei der sogenannten Selbstgärung in der Zelle gegeben während der langsamen Abtötung [166] der mit Wasser verdünnten Hefe bei dem Verfahren der Invertinfreilegung[1]: „Die frische Preßhefe wird in das gleiche bis doppelte Volumen Wasser eingetragen, mit 5 bis 10% ihres Gewichtes an Toluol vermischt und nach kräftigem Durchschütteln, das man alle Tage wiederholt, bei Zimmertemperatur 4 bis 7 Tage der Autolyse überlassen. Nach wenigen Stunden setzt unter beträchtlicher Gasentwicklung Selbstgärung ein, die bis zum folgenden Tage beendet ist." Die Invertinbildung in diesen Fällen ist nicht, wie früher angenommen worden, eine postmortale, sondern sie geht, wohl verkoppelt mit der Gärung der Inhaltskohlehydrate, der Abtötung der Hefe voraus, ähnlich wie die bei Dialyse von Pflanzenwurzeln beobachtete Peroxydasebildung[2]: „Der Zuwachs der Peroxydase unter den geschilderten Bedingungen beruht auf der noch fortdauernden Lebenstätigkeit der Pflanzenzelle."

Experimenteller Teil.

Invertinbildung durch Gärung bei minimaler Zuckerkonzentration.

Die in der Einleitung gewürdigten Untersuchungen über Enzymbildung in der Hefe haben als Methode die Hefeführung unter Vergärung konzentrierter Zuckerlösung bei hoher Temperatur ausgebildet. Von den heftigen Gärungen, die man 24 Stunden dauern und auslaufen läßt, werden vier aufeinanderfolgende ausgeführt. Es sind meistens 2proz. bis mehr als 15proz. Zuckerlösungen, worin die Hefe geführt wird, und die alle verhältnismäßig konzentriert zu nennen sind. Dagegen beruht unsere Methode der Invertinvermehrung auf Gärführung bei minimaler Zuckerkonzentration. Von älteren Erfahrungen über die günstigen Einflüsse der hohen Gärtemperatur und der Zusätze von mineralischen Nährsalzen sowie Stickstoffverbindungen wird dabei Nutzen gezogen.

Neben dem entscheidenden Faktor der niedrigsten Zuckerkonzentration ist noch ein zweiter Umstand wichtig, d. i. die [167] Auswahl der Hefe, genauer ihres Entwicklungszustandes, nämlich die Berücksichtigung des geeigneten Zustandes hinsichtlich ihrer spezifischen Lebensenergie. Das Material von untergäriger Brauereihefe, das uns bisher für die Arbeiten über Invertin diente, war die zum Verkauf be-

[1] I. Abh. a. a. O., und zwar S. 53.

[2] R. Willstätter, Ann. d. Chem. Bd. 422, S. 47 [1920], und zwar S. 53.

stimmte Abfallhefe der Brauerei. Es hat sich nun gezeigt, daß die von der Reinzuchthefe und der Stammwürze der Hefeführung entnommenen Teilstämme sich so lange besonders gut zur Enzymvermehrung eignen, als sie nur wenige oder eine mäßige Anzahl von Führungen im Brauereibetrieb durchgemacht haben. Wenn die Teilstämme der Hefe dann eine größere Zahl von Gärungen geleistet haben und durch Degenerieren, sei es infolge geringer Gärkraft, sei es wegen schlechten Absitzens für die Brauerei untauglich geworden sind, dann kann man damit noch leicht Invertinzunahmen, wie sie bisher beschrieben worden sind oder auch bessere, erzielen, aber doch lange nicht so günstige Invertingehalte wie mit Hefen, die für die Brauerei noch ganz tauglich sind. Die Bezeichnung der angewandten Hefen z. B. Rc 10/VI gibt an, daß der zehnte Teilstamm der Reinzuchthefe Rc durch sechs Gärungen geführt worden ist. Die Abfallhefen pflegen nach 7 bis 30 Führungen ausgeschaltet zu werden. Hefe, die schon für 4 bis 7 Führungen gedient hat, war noch gut geeignet für die Invertinanreicherung. Die folgende Tab. 3 zeigt in gleichlaufenden Versuchen, die unter ähnlichen Bedingungen wie später beschrieben ausgeführt wurden, die Überlegenheit einer gärungstauglichen Hefe gegenüber der Abfallhefe.

Tabelle 3. Invertinanreicherung in Reinzuchthefe und Abfallhefe.

Abfallhefe, Zeitwert 417				Hefe Rc 10/VI, Zeitwert 284			
$1^1/_2$ Stunden	30%	Zucker	161	$1^1/_4$ Stunden	20%	Zucker	104
$5^1/_2$,,	70%	,,	125	$5^1/_2$,,	60%	,,	45
10 ,,	110%	,,	123	16 ,,	100%	,,	28
Abfallhefe, Zeitwert 300				Hefe Rc 10/V, Zeitwert 236			
0 Stunden	30%	Zucker	95	8 Stunden	33%	Zucker	45
19 ,,	48%	,,	71	19 ,,	53%	,,	36

[168] Die in der Brauerei nur wenige Male geführten Hefen erwiesen sich von Anfang an invertinreicher als Hefe nach zahlreichen Führungen. Für die Abfallhefe der Löwenbrauerei hatten wir 1918 bis 1920 den durchschnittlichen Invertinzeitwert 341, 1920 bis 1922 im Durchschnitt 328, 1923 bis 1924 ebenso 331 gefunden. Eine Hefeprobe der Reinzuchtführung Rc wies dagegen den günstigen Zeitwert 148 auf. Der Zeitwert verschlechterte sich im Brauereibetrieb und zwar zu 278 bis 290 im Laufe von 5 bis 7 Führungen. Der durchschnittliche Wert der verschiedene Male geführten Teilstämme betrug 218.

Rc 0	15/II	15/III	13/IV	12/IV	12/V	12/VI	10/VI	10/VII
148	165	165	187	216	278	230	284	290

Für die Tauglichkeit ist aber nicht der Anfangsinvertingehalt bestimmend; Hefe, deren Zeitwert in wenigen Führungen auf 278 bis 290 und zu noch ungünstigeren Werten gelangt war, zeigte sich auch noch gut brauchbar. Die Steigerung der Invertingehalte solcher Hefen, die aus den Beispielen der Tab. 4 und einem in den Abbildungen ersichtlichen weiteren Beispiel zu ersehen ist, beläuft sich auf das 8- bis 15fache. Bei ungünstigen Anfangswerten einer zur Enzymanreicherung tauglichen Hefe steigt der Invertingehalt auf das 13- bis 15fache an, bei Hefen von besonders günstigen

Anfangswerten auf das 8- bis 10fache. Die Führung bei minimaler Zuckerkonzentration ergibt nach 8 bis 24 Stunden, selten schon nach 5 Stunden, Endwerte von 22 bis 15, die sich nicht weiter verbessern lassen. Aber schon nach 3- bis 4stündiger Führung mit einem Verbrauch von nur 30 bis 40% der Preßhefe an Zucker werden Zeitwerte von 40 bis 30 erreicht. Während uns also bisher unvorbehandelte Hefe vom Invertinzeitwert 300 (Saccharasewert 0,0033) als gutes Ausgangsmaterial gedient hat, steht nunmehr nach einer gut reproduzierbaren, kurzen Vorbehandlung Hefe vom Zeitwert 20 oder noch invertinreichere (S.W. mindestens 0,05) zur Verfügung.

Der Temperatureinfluß ist bei der Führung mit minimaler Zuckerkonzentration geringer als mit hoher. Wie in den Versuchen von H. v. EULER und J. MEISENHEIMER war die Temperatur von etwa 27° die günstigste. Bei 20° war das [169] Ergebnis in bezug auf die Geschwindigkeit der Invertinvermehrung und hinsichtlich des Endwertes etwas weniger günstig. Bei hoher Temperatur (32°) fanden wir abweichend von den früheren Autoren einen fast ebenso günstigen Verlauf wie bei 27°. Unter den Bedingungen der älteren Führung mit hoher Zuckerkonzentration wird die ohnedies zu rasche Gärung noch wesentlich beschleunigt, während die Temperaturerhöhung auf die Gärung bei geringster Zuckerkonzentration wenig Einfluß haben kann.

Auch die Wasserstoffionenkonzentration hat in einem weiteren Bereich keinen Einfluß. Wir finden unter unseren Versuchsverhältnissen ein Gebiet von $p_H = 4{,}5$ bis 7,0 für die Invertinbildung optimal, während H. v. EULER und O. SVANBERG[1] mit viel weniger Hefe in einer gegebenen Flüssigkeitsmenge und mit viel Zucker ein Maximum der Enzymbildung bei $p_H = 5$ bis 6 beobachten.

Unter den Bedingungen unserer Gärführung erfolgt keine oder nur geringe Hefevermehrung.

Die Hefelieferungen wurden zur Aufbewahrung nicht abfiltriert, sondern besser im Biere abgekühlt und kalt aufbewahrt; sie blieben unter diesen Umständen 7 bis 10 Tage ohne Änderung der Zeitwerte und ohne merkliche Änderung des Verhaltens brauchbar.

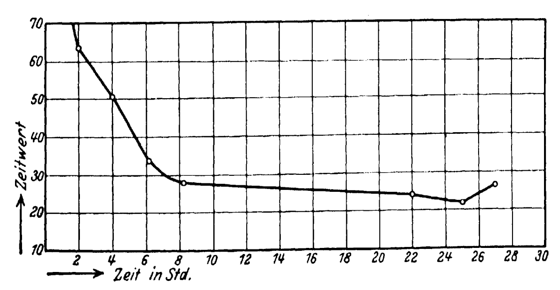


Abb. 1. Abhängigkeit der Invertinvermehrung von der Zeit.

[1] Diese Zs. Bd. 106, S. 201 [1919], und zwar S. 235; H. v. EULER, „Chemie der Enzyme", I. Teil, 3. Aufl. (München 1925), S. 403.

[170] Tabelle 4. Beispiele der Invertinanreicherung.

(200 g abgepreßte Hefe von 25% Trockengewicht, geführt bei 27° in 4 l Flüssigkeit, enthaltend 8 g KH_2PO_4, 8 g $NH_4H_2PO_4$, 2 g KNO_3, 2 g $Mg(NO_3)_2 \cdot 6\,H_2O$. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer des Rührens. Abtrennung und Erneuerung der Flüssigkeit geschah etwa 3mal, z. B. am ersten Tage nach je 2 bis 3 Stunden. Die Ergebnisse sind in Invertingehalten der Hefe ausgedrückt.)

1. Beispiel. Hefe Pr 4/III vom Zeitwert 402.

10 Std., 33% Zucker	15 Std., 43% Zucker
Zeitwert 42	Zeitwert 38

2. Beispiel. Hefe Rc 10/VII vom Zeitwert 290.

a)	1½ Std., 20%	5 Std., 50%	7 Std., 60%	17 Std., 95%
	60	45	33	24
b)	1½ Std., 20%	14 Std., 55%	27 Std., 105%	
	56	32	21	

3. Beispiel. Hefe Rc 12/V vom Zeitwert 278.

3 Std., 40%	5 Std., 60%	17 Std., 85%
41	31	19

4. Beispiel. Hefe vom Zeitwert 246.

2½ Std., 15%	5½ Std., 25%	8½ Std., 35%	19 Std., 52%	34 Std., 69%
116	69	45	32	46

[171]

5. Beispiel. Hefe Rc 12/IV vom Zeitwert 216.

3½ Std., 45%	4½ Std., 55%	14 Std., 75%	17 Std., 95%	28 Std., 145%
41	34	27	18	19

6. Beispiel. Hefe Rc o vom Zeitwert 148.

1½ Std., 20%	3 Std., 40%	17 Std., 80%	23 Std., 97%
63	36	20	17,7

7. Beispiel. Hefe Rc 13/IV vom Zeitwert 187.

a)

2 Std., 20%	65 Std., 60%	17 Std., 80%
65	24	27

b) Langdauernde Führung.

2 Std., 20%	4 Std., 60%	7 Std., 80%	21 Std., 110%	27 Std., 129%	41 Std., 140%
63	41	29	26	23	20
48 Std., 170%					
23					

c) In Abb. 1 und 2 dargestellt.

8. Beispiel. Hefe Rc 15/II vom Zeitwert 165.

a)

3 Std., 30%	4 Std., 40%	6 Std., 60%	16 Std., 80%	22 Std., 90%	32 Std., 100%
42	36	28	24	22	15

b) Unter starkem Rühren.

3 Std., 30%	4 Std., 40%	5 Std., 50%
31	24	19

c) Unter langsamem Zusatz der Zuckerlösung.

5 Std., 25%	18 Std., 42%	22 Std., 59%	34 Std., 70%	38 Std., 89%
42	30	25	22	17,6

[172]

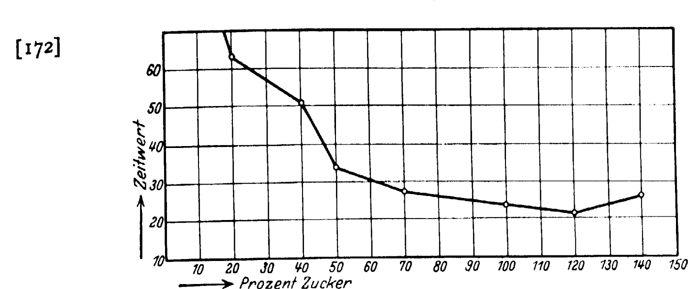


Abb. 2. Abhängigkeit der Invertinvermehrung von der Zuckermenge.

Gärführung: 200 g abgepreßte Hefe werden in 4 l Nährsalzlösung eingetragen, die in einem 10-l-Filtrierstutzen auf 28° vorgewärmt ist. Sie enthält je 8 g primäres Kaliumphosphat und primäres Ammonphosphat, sowie je 2 g Kaliumnitrat und wasserhaltiges Magnesiumnitrat. Die Flüssigkeit wird mit mechanischer Rührung in starker Bewegung gehalten. Das Gefäß befindet sich in einem elektrisch geheizten Bade, das die Temperatur während der Versuchsdauer auf 27° hält. 20proz. Rohrzuckerlösung tropft aus einer tubulierten Flasche durch eine Capillare ein und zwar so, daß 100 ccm Lösung (10% Zucker bezogen auf das Gewicht der abgepreßten Hefe) in einer Stunde einfließen. Nach je 2 bis 3 Stunden trennt man zweckmäßig die Hefe von der alkoholhaltigen Flüssigkeit und erneuert die Nährlösung. Man kann nach den ersten 2 Stunden noch leicht dekantieren, nach einer Führung von 3 Stunden gewöhnlich nicht mehr, oder nur manchmal auf Zusatz von kaltem Wasser. Dann pflegen wir die Abtrennung mit der Zentrifuge auszuführen, zweckmäßig mit einer Überlaufzentrifuge von Haubold. Zumeist wird die Führung so vorgenommen, daß in 5 bis 8 Stunden 50 bis 80% Zucker eintropfen, sodann durch eine engere Capillare weitere 10 bis 20% über Nacht. Die übliche Versuchsdauer beträgt etwa 17 Stunden, die günstigsten Werte wurden allerdings erst nach noch etwas längerer Führung erreicht (vgl. die Beispiele 8a und 8c).

Bei der beschriebenen Gärführung bleibt die Hefe bis [173] zum Ende der üblichen Versuchszeit in sehr gutem Zustand; sie behält normalen Geruch und sie setzt sich nach kurzen Gärungen oft ebenso gut wie zu Anfang ab. Die Invertingehalte zeigen nach Erreichung der besten Zeitwerte im allgemeinen einen ganz langsamen Rückgang, der nicht weitgehend zu sein pflegt und geringer ist, als bei den von J. Meisenheimer beschriebenen 4 bis 5 Tage und noch länger dauernden starken Gärungen[1].

Einige Beispiele der Tab. 4 zeigen folgende Verschlechterung der Invertinzeitwerte:

Beispiel 5	Beispiel 7a	Beispiel 7c	Beispiel 7b
17 Stunden, 18	6,5 Stunden, 24	22 Stunden, 22	41 Stunden, 20
28 „ 19	17 „ 27	24 „ 26	48 „ 23

[1] Aus den Angaben von J. Meisenheimer und L. Semper (Biochem. Zs. Bd. 67, S. 374 [1914]) berechnen wir sinkende Invertingehalte zum Beispiel von Hefezeitwert 58 zurückgehend auf 80.

Es kommt daher bei günstigen Führungen vor, daß das Optimum des Invertingehaltes in die Beobachtungspause der Nachtzeit fällt.

Bei dem Rückgang der Enzymgehalte ließ sich in der phosphathaltigen Außenflüssigkeit Invertin nachweisen, in einem Fälle etwa die Hälfte der Menge, welche die Hefe nach Erreichung des optimalen Wertes verloren hatte. In einem anderen Falle, bei einem Zeitwert von 19,4 nach 18,4 beim Aufbewahren über Nacht in Wasser, wurde etwa die ganze der Hefe fehlende Invertinmenge in der Außenflüssigkeit nachgewiesen.

Mit den in der Vorschrift angegebenen Zuckermengen war der Erfolg der beste. Beim Zutropfen der doppelten Zuckermengen in denselben Zeiten war der Enzymzuwachs nicht höher, weniger Zucker war unzureichend.

Zeitwerte von Hefe Rc 10/VI (Anfangszeitwert 284).

Versuchsdauer	1 Std.	3 Std.	5½ Std.	16 Std.	22 Std.
Mit gewöhnlicher Zuckermenge	20%; 100	40%; 57	60%; 35	100%; 27	120%; 25
Mit doppelter Zuckermenge . .	40%; 119	80%; 49	120%; 41	200%; 29	—
Mit halber Zuckermenge . . .	10%; —	20%; —	30%; 57	50%; 37	—

Die Erfahrung, daß die Enzymbildung unter den Bedingungen schwacher Gärungen mehr gefördert wird als bei intensivem Gärverlauf, ist aus vielen vergleichenden Versuchen hervorgegangen. Dabei hat es sich gezeigt, daß auch unter [174] den Versuchsbedingungen von H. v. EULER sowie von J. MEISENHEIMER etwas bessere Invertinzeitwerte erreicht werden können, wenn das Erfordernis eines günstigen Energiezustandes der Hefe erfüllt ist.

Mit einem gut brauchbaren Hefematerial Rc 13/IV verglichen wir die Gärung mit zutropfender Zuckerlösung und stündlichem Eintragen von 10% Zucker. In letzterem Falle war der Invertinzuwachs beim Zeitwerte 50 in etwa derselben Zeit beendet, die zur Erzielung eines viel günstigeren Invertinwertes nach der neuen Methode hinreichte.

	2 Std., 20% Zucker	4 bis 5 Std., 40% Zucker	6 bis 7 Std., 60% Zucker
Mit zutropfendem Zucker	65	30	24
Stündlich 10% ,,	76	52	50

Die von J. MEISENHEIMER geprüfte Methodik von H. v. EULER und D. JOHANSSON, die in der Untersuchung von J. MEISENHEIMER, ST. GAMBARJAN und L. SEMPER die günstigsten Zeitwerte (42 und 47) ergeben hatte, führte mit unseren besten Hefeproben Rc 15/II und Rc 15/III in 70 Stunden mit 200% Zucker zum Zeitwert 42, während wir mit 50 bis 100% Zucker in 5 bis 32 Stunden zu Invertinzeitwerten von 15, 18, 19 und 20 gelangen konnten.

5 g Hefe Rc 15/II und Rc 15/III wurden in 500 ccm Nährlösung, enthaltend 10 g Zucker, 2,5 g KH_2PO_4, 0,12 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ und 2 g Asparagin, bei 28° geführt. Nach 70 Stunden betrugen die Zeitwerte 42,5 und 42,2.

Wie in den älteren Versuchen, so läßt sich in unserem Verfahren der Rohrzucker durch Traubenzucker ohne Änderung [175] der Geschwindigkeit und des Endwertes

der Invertinbildung ersetzen. Mit rohem Rübenzucker war das Ergebnis etwas ungünstiger als mit gereinigtem. Mit Malzzucker wurde geringerer Invertinzuwachs gefunden als mit Rohrzucker. Lactose ist für die Invertinbildung unbrauchbar, im Gemisch mit Rohrzucker ist sie ohne Einfluß; auch Glycerin ist nutzlos

		Zeitwerte bei gleichlaufender Gärführung		
Hefe Rc 12/V	mit Saccharose . . .	41	31	19
	mit Glucose	47	32	21
Hefe Rc 15/II	mit Saccharose . . .	42	28	24
	mit Glucose	43	24	24
	mit Maltose	58	—	63

Lagerung der Ausgangshefen in konzentrierter Zuckerlösung oder in verdünnter Phosphat- und Nitratlösung bewirkte wohl einiges Ansteigen der Invertingehalte. Die Vorbehandlung mit Zuckerlösung hat aber auf die Invertinbildung bei nachfolgender Gärführung einen ungünstigen Einfluß, nicht die mit Phosphat.

Hefen, die zu Invertinwerten von 27 bis 20 geführt waren, ließen sich durch Lagern während einiger Stunden in 50proz. Glucose- oder Saccharoselösung um 2 bis 5 Einheiten des Zeitwertes verbessern.

Hefe Rc 12/V vom Zeitwert 24 verbesserte sich in 2 Beispielen in 3 Stunden zu 21 und weiter zu 20 und 19. Rc 12/VI vom Zeitwert 27 ergab 24, Rc 13/IV vom Zeitwert 27 ergab 22, Rc 15/III vom Zeitwert 20 ergab 18.

Andererseits waren die zu den höchsten Invertingehalten geführten Hefeproben sehr empfindlich; sie zeigten unter denselben Bedingungen Rückgang, z. B. von 18 auf 20 und 28.

Ähnliches Verhalten beobachteten wir beim Lagern der invertinreichen Hefen bei 20° in der alkoholhaltigen Nährsalzlösung. In einem bis zwei und vier Tagen verbesserten sich Zeitwerte von 27 und 25 und 22 auf 19 bzw. 21 und 20. Auch beim Lagern in Wasser kamen, vielleicht nur durch Exosmose von Inhaltsstoffen der Hefe, kleine [176] Zeitwertverbesserungen vor. Aber diese Erscheinung ist unsicher, wie die Zunahme in konzentrierter Zuckerlösung. Einige Hefeproben waren empfindlich, nämlich solche vom Zeitwert 15 und 17,4 verschlechterten sich schon in einem halben und ganzen Tag zu 21 bzw. 27.

Die im beschriebenen Verfahren angeratene wiederholte Abtrennung der Hefe von der alkoholhaltigen Nährlösung hat einen günstigen Einfluß, der deutlich, wenn auch nicht bedeutend ist. Bequemer ist das Verfahren ohne Unterbrechung durch Dekantieren oder Abzentrifugieren der Hefe. Die Invertinzunahme ist aber dann etwas geringer als unter den angegebenen Bedingungen. Die nachteilige Wirkung der alkoholhaltigen Außenflüssigkeit scheint hauptsächlich auf ihrem Alkoholgehalt zu beruhen. Setzt man nämlich jedesmal nach dem Dekantieren die dem vergorenen Zucker entsprechende Alkoholmenge zur neuen Nährlösung hinzu, so bleibt die Invertinvermehrung auch etwas hinter dem unter üblichen Bedingungen ausgeführten Vergleichsversuch zurück.

In der angewandten Nährlösung haben die Mineralsalze günstige Wirkung. Mit Kalium- und Ammoniumphosphat ohne die Nitrate scheint das Ergebnis nur um ein geringes ungünstiger zu sein, Vermehrung der Phosphatmenge ist ohne Einfluß. Durch Weglassen der Stickstoffverbindungen wird die Enzymbildung benachteiligt; aber Zusatz organischer Stickstoffverbindungen zum angewandten Ammoniumphosphat (gegebenenfalls zusammen mit Nitrat), nämlich von Harnstoff, Glykokoll, Pepton oder Nucleinsäure, waren ohne Nutzen, sie schienen sogar den Invertinzuwachs zu hemmen.

Andere Enzymgehalte während des Invertinzuwachses.

Maltase.

Für die Bestimmung des Maltasegehaltes in der Hefe haben R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[1] eine Methode geschaffen, die auf Abtötung und Verflüssigung der Hefe durch [177] Essigester, Neutralisation der gebildeten Säure und Einstellung des für Maltase günstigen $p_H = 6{,}8$ beruht. Verschiedene nach diesem Verfahren analysierte Münchener Brauereihefen zeigten im Maltasegehalt viel größere Differenzen als die im Invertingehalt vorkommenden. Die Maltasezeitwerte der untersuchten untergärigen Bierhefen lagen zwischen 29 und 195, diejenigen der Löwenbrauereihefen betrugen ungefähr 29 bis 33.

In unseren Versuchen wurde der Gang der Maltasezeitwerte während der weitgehenden Saccharasevermehrung verfolgt und zwar genau nach der Bestimmungsweise von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, die sich bewährt hat. Die zur Invertinanreicherung geeignetsten Hefeproben, deren Anfangsinvertingehalte besonders günstig waren, wiesen Anfangsmaltasegehalte auf, welche die früher beobachteten nicht übertrafen (nämlich 25 bis 39). Bei der Gärführung mit niedrigster Zuckerkonzentration und zwar mit Rohrzucker oder Traubenzucker oder Malzzucker hat sich dann ergeben, daß während der etwa 10fachen Verbesserung des Invertingehaltes die Maltase öfters ein wenig zunahm, z. B. um $^1/_5$ bis $^4/_5$, nämlich um $^1/_5$, wenn der Anfangswert schon hoch war (25), um $^4/_5$, wenn der Anfangswert weniger günstig war (39). Die günstigsten Maltasezeitwerte, die in den Versuchen der Enzymbildung erreicht wurden, liegen zwischen 17 und 20. Die Maltasezunahme ist also verhältnismäßig gering.

Tabelle 5. Vergleich von Maltase- und Saccharasezuwachs.

Gärführung mit	Anfangszeitwerte für		Zeitwerte nach Anreicherung			
			nach einigen Stunden		nach einem Tag	
	Invertin	Maltase	Invertin	Maltase	Invertin	Maltase
Saccharose . . .	187	39	38	22	28	—
,, . . .	165	25	53	22	22	20
Glucose	165	25	30	28	24	27
Maltose	165	25	58	24	63	45
Malzextrakt . . .	165	25	40	17	32	20

[1] Diese Zs. Bd. 111, S. 157 [1920], und zwar S. 168.

[178] β-Glucosidase.

Die Wirkung des in unsern Bierhefen selten und spärlich anzutreffenden Enzyms[1] versuchten wir mit Salicin als Substrat unter den von R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER[2] sowie R. WILLSTÄTTER, R. KUHN und H. SOBOTKA[3] angegebenen Bedingungen zu bestimmen, nämlich bei $p_H = 4{,}4$, bei 30°, mit 0,02n-Salicinlösung und zwar mit der einem Gramm getrockneter Hefe entsprechenden Menge der abgepreßten Hefe in 100 ccm Glucosidlösung. Die Reaktionszeit betrug 4, 6 und 17 Stunden. Die Hefe untersuchten wir entweder so wie bei der Saccharasebestimmung durch Einwirkung frischer Hefe auf das Substrat, oder genau wie bei der Maltasebestimmung nach rascher Abtötung. Angewandt wurden die Hefen Rc 15/II und Rc 15/III vor der Gärführung und nach Enzymanreicherung zu Invertinzeitwerten von 17,4 und 19,7. In keinem dieser Fälle gelang es, β-Glucosidase nachzuweisen. Die Vermehrung der Enzyme in der Hefe erstreckt sich also nicht auf die β-Glucosidase.

Protease.

Die proteolytische Wirkung der Hefe, für die es noch wenig Material quantitativen Vergleichs gibt, wurde von Herrn Dr. W. GRASSMANN in Versuchen geprüft, die zu einer später zu veröffentlichenden Untersuchung über Hefetrypsin gehören. Die tryptische Wirkung läßt sich nicht mit unveränderter Hefe messen; sie wurde vielmehr mit Autolysaten bestimmt, die mit quantitativen Invertinausbeuten dargestellt waren, und zwar unter Anwendung von 0,5 bis 4 ccm Autolysat mit 0,2 g Pepton in 10 ccm Spaltungsansatz während 24 Stunden bei 40°. Günstige Acidität wurde mit 1 ccm mol/3-Phosphatpuffer von p_H 6,5 eingestellt. Die Reaktion wurde durch Titration der [179] Aciditätszunahme mit n/5-Kalilauge gemessen. Zur Beurteilung des proteolytischen Wertes diente ein gut wirksames Autolysat (dargestellt bei saurer Reaktion, gealtert) als Standard:

ccm Autolysat	0,5	1,0	2,0	4,0
Spaltung (ccm n/5-KOH)	2,66	3,20	4,18	4,48

Die zumeist angewandte Hefe Rc 10/VI ergab durch Autolyse unter Neutralisation bei Zimmertemperatur einen etwas günstigeren Wert als das Standardautolysat. Nach der Invertinanreicherung (zu Zeitwerten 35 bis 28) autolysiert, ergab diese Hefe Werte der proteolytischen Wirksamkeit, die je nach dem Verfahren der Autolyse etwas besser oder schlechter waren als bei der Ausgangshefe. Die von der Art und Weise der Hefeverflüssigung und Enzymfreilegung bedingten Ausschläge sind viel größer

[1] In Macerationssaft von Münchener Trockenhefe, allerdings einem nicht gut definierten Material, haben C. NEUBERG und E. FÄRBER (Biochem. Zs. Bd. 78, S. 264 [1917]) β-Glucosidase nachgewiesen, die in Bierhefe zuerst von R. PIRIA gefunden worden war (Ann. d. Chem. Bd. 56, S. 35 [1845], und zwar S. 67).

[2] Diese Zs. Bd. 121, S. 183 [1922].

[3] Diese Zs. Bd. 129, S. 33 [1923].

Tabelle 6. Proteasegehalt bei Invertinanreicherung.

	Menge des ang. Autolysats ccm	Spaltung ccm n/5-KOH	Äquiv. ccm des Standard-autolysats	Proteol. Wirkung, in Proz. des Standard-autolysats
Ausgangshefe, Zeitwert 284				
bei 30° verfl., bei 18° aut.	1	3,51	1,24	124
1. Gärführung, Zeitwert 35				
a) bei 30° verfl. und aut.	2	3,66	1,48	74
b) bei 30° verfl., bei 18° aut.	1	3,66	1,48	148
c) bei 35° verfl., bei 18° aut.	2	3,70	1,50	75
2. Gärführung, Zeitwert 44				
bei 35° verfl. und aut.	2	3,32	1,02	51
3. Gärführung, Zeitwert 32,5				
bei 30° verfl. und aut.	2	3,57	1,12	56
4. Zeitwert 28				
bei 30° verfl. und aut.	2	4,01	1,90	95

als die Unterschiede in der tryptischen [180] Wirkung der Ausgangshefe und der geführten invertinreichen Hefe. Proteasezuwachs ist also nicht in nennenswertem Maße gefunden worden.

Gärvermögen.

In den Versuchen von H. v. EULER und D. JOHANSSON[1] sowie von O. SVANBERG[2] war teils eine Verminderung, teils eine geringe Verbesserung der Gärkraft zutage getreten, als man den Invertingehalt der Hefe auf das 3- bis 5fache, auf Zeitwerte von schätzungsweise 100 steigerte. Die nach dem neuen Verfahren zu hohem Ansteigen des Invertingehaltes geführten Hefen blieben in ihrem Gärvermögen unverändert. Vergleichsweise wurden die Halbgärzeiten nach R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[3] bei 30° unter ständigem Schütteln im Thermostaten mit der 0,2 g Trockenhefe entsprechenden Menge frischer Hefe in 20 ccm 5proz. Glucoselösung bestimmt. Die Halbgärzeit, für die in einer früheren Probe von Löwenbräuhefe 80 gefunden worden, bewegte sich vom Anfang bis zum Ende der Invertinsteigerung zwischen 112 und 141.

Hefe Rc 15/II	Inv.-Zeitw. 165	Halbgärzeit 112 Min.
2 Stunden mit 20% Zucker gef.	„ 49	„ 123 „
4 „ „ 40% „ „	„ 35	„ 141 „
18 „ „ 96% „ „	„ 20	„ 112 „

Bei dieser Untersuchung hat uns der Vorstand des Gärungslaboratoriums der Löwenbrauerei München, Herr Dr. B. BERGDOLT, seine freundliche entgegenkommende Unterstützung geliehen, wofür wir ihm zu Dank verpflichtet sind.

Auch sprechen wir unsern Dank Herrn GERHARD KÜNSTNER aus, der uns bei unseren Versuchen aufs beste unterstützt hat.

[1] Diese Zs. Bd. 78, S. 246 [1912]. [2] Diese Zs. Bd 109, S. 65 [1920].
[3] Diese Zs. Bd. 115, S. 211 [1921], und zwar S. 219.

Zeitschrift für physiologische Chemie 147, S. 248 [1925].

55. ZUR KENNTNIS DES INVERTINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER, KARL SCHNEIDER und EUGEN BAMANN.

Zehnte Abhandlung.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 1 Abbildung im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 6. Mai 1925.)

Einleitung.

Für die Trennung der Saccharase von den andern Bestandteilen der Autolysate kennt man keine chemische Methode. Es ist in unseren vorangegangenen Arbeiten nur mit Adsorptionsmethoden gelungen, den Reinheitsgrad des Enzyms beträchtlich zu steigern und zwar auf das 20fache der enzymatischen Konzentration, die nach den noch weniger auswählenden, älteren Verfahren der Fällung durch Alkohol, der Abtrennung von Fremdkörpern durch Bleiacetat und durch Dialyse zu erzielen war. Mit Invertin vom Saccharasewert 5,9 bis 6,7 (Zeitwert 0,17 bis 0,15) hat sich die präparative Arbeit dem erreichbaren Ziele genähert. Ein solches Präparat ist zusammengesetzt aus:

a) Enzymatischer Substanz, nämlich Saccharase selbst, weiteren polyosen- und glucosidespaltenden und anderen Enzymen und aus Substanzen, die den aktiven Enzymen am nächsten verwandt sind, nachweislich Zersetzungsprodukten (inaktiviertem Enzym) und wahrscheinlich Vorstufen. Für die Abtrennung der einem Enzym am nächsten verwandten Stoffe ist die Adsorptionsmethode bisher noch wenig ausgebildet.

b) Fremden Stoffen, die vom Zerfall des Hefeprotoplasmas [249] herrühren. Sie üben eine Schutzwirkung auf das Invertin aus, mit dem sie adsorptiv zusammenhängen. Obwohl nicht die einzelnen Begleitstoffe, wie Hefegummi, Tryptophanpeptid oder Tyrosinpeptid, eine spezifische Bedeutung haben und das Enzym ihre Gesellschaft zu wechseln vermag, so hat doch ihre Abtrennung Beständigkeitssturz oder -abnahme zur Folge. „Die Kunst der Arbeit wird es sein, das Minimum von Schutzstoffen aufzusuchen, womit die Saccharase bei unverminderter Aktivität gehalten werden kann.“

Obwohl die Saccharase, wie sie bisher beschrieben wurde, noch lange nicht aus reiner Substanz der Gruppe a) besteht, führt die Adsorptionsmethode, so lange nicht neue Verfeinerungen zu Hilfe kommen, nicht weiter, weil sie für die Abtrennung sogar von ganz fremdartigen Stoffen, geschweige von enzymartigen, nicht genügend auswählend ist. Wenn Invertin z. B. eine sehr starke Beimischung von Tryptophanpeptid mitschleppt (9,2% Tryptophan), zeigt es gegen Tonerde (vgl. die VII. und VIII. Abh.) das Adsorptionsverhalten eines homogenen Stoffes. Gewisse adsorptiv zusammenhängende Gemische verhalten sich bei den Adsorptionsvorgängen wie einheitliche chemische Verbindungen.

Für die Darstellung des Invertins bedeutet es eine günstige Grundlage, wenn es gelingt, das Verhältnis der Saccharase zu anderer enzymartiger Substanz zu verbessern. Dies ist der Sinn der im folgenden versuchten Anwendung invertinreicher Hefe. Sie beruht auf der Erkenntnis unserer IX. Abhandlung, daß bei der hohen Anreicherung des Invertins unter den Bedingungen geeigneter Gärführung, wobei das 10- bis 20fache des Invertingehaltes gewöhnlicher Hefe erreicht wird, andere Enzyme, wie Maltase, Trypsin, Enzyme des Zymasekomplexes u. a. nur geringen oder gar keinen Zuwachs erfahren. Die dadurch bedingte wesentliche Verschiebung des Verhältnisses von Saccharase zu anderen Stoffen der Gruppe a) wird noch durch ein in dieser Arbeit beschriebenes neues Verfahren der Autolyse verbessert, das zu Invertinlösungen von großer Beständigkeit führt. Dadurch wird erreicht, daß sich der Saccharase auch bei länger dauernden Operationen mit [250] gereinigten Präparaten, z. B. bei der Dialyse, nur wenig zerstörtes Enzym beimischt.

Auf das neuartige Material der Hefe vom Zeitwert 20 sind die bisher ausgearbeiteten Verfahren der Autolyse nicht mit gleichmäßigem Erfolg anwendbar. Die Freilegung nimmt einen günstigeren Verlauf, wenn die Hefe unverdünnt durch Behandlung mit Toluol abgetötet und dann vom ausgetretenen Verflüssigungssaft abgetrennt wird. Diese fraktionierte Autolyse, bei 30° weitergeführt, liefert Autolysate, deren Saccharasekonzentration 4- bis 8mal größer ist als die der angewandten Hefen, während bisher der Übergang vom Pilz in das Autolysat die enzymatische Konzentration nur aufs doppelte bis höchstens dreifache gesteigert hatte. Die Invertinlösungen aus der fraktionierten Freilegung entsprechen nämlich Saccharasewerten von 0,4 bis 0,2 (Zeitwert 2,5 bis 5), die allein durch Dialyse bis auf 1,82 (Zeitwert 0,55) ansteigen. Während in der gewöhnlichen Bierhefe auf 1 S.E. 1100 mg Hefegummi und 150 mg Tryptophan treffen, sind in den neuen Autolysaten auf 1 S.E. nur 8 mg Hefegummi und 2,5 mg Tryptophan, nach der Dialyse 0,34 mg Tryptophan enthalten.

Aus den verbesserten Autolysaten lassen sich ohne die bisher erforderlichen Prozesse der Alterung, der Fällung durch Alkohol usw. unmittelbar mit einer einzigen Adsorption an Kaolin Invertinpräparate vom S.W. 5,5 (Zeitwert 0,18) gewinnen, die also den bisher besten an Saccharasekonzentration nahestehen und sie an Beständigkeit erheblich übertreffen. In ihnen dürfte bei gleichem Reinheitsgrad der Anteil an begleitender enzymartiger Substanz stark vermindert, der Anteil an Fremdstoffen

erhöht sein. Wiederholte Anwendung der Tonerde- oder Kaolinadsorption unter den üblichen Bedingungen bewirkte im allgemeinen keine Steigerung des Reinheitsgrades. Nur vereinzelt eigneten sich solche Präparate für Verbesserungen der Adsorptionsverfahren in bezug auf ihre selektive Wirkung. Dabei erhöhte sich der Saccharasewert über den bisher günstigsten Wert um 28% hinaus, nämlich auf 8,55 (Zeitwert 0,117). Da sich in einem solchen Enzympräparat noch ein Ballast von 8,6% Tryptophan nachweisen läßt, das nicht [251] als solches, sondern als Peptidkomponente vorkommen dürfte, so mag leicht die Beimischung enzymfremder Substanz in dem besten Saccharasepräparat zum Beispiel die Hälfte ausmachen.

Experimenteller Teil.

I. Analytische Beschreibung der Hefen und Autolysate.

A. Hefegummi.

1. Bestimmung des Hefegummis.

Die analytische Methode soll für die Bestimmung des Hefegummis in Hefen und in Invertinpräparaten, besonders häufig in Hefeautolysaten dienen, die auch reduzierende Zucker, Proteinsubstanzen, Phosphate u. a. enthalten. Sie beruht auf der von E. SALKOWSKI [1] entdeckten Fällung des Hefegummis mit Fehlingscher Lösung. Zur quantitativen Bestimmung hat SALKOWSKI den Niederschlag in verdünnter Salzsäure aufgelöst und den freien Gummi mit Alkohol nochmals gefällt. Einige Abänderungen waren angezeigt wegen des Gehaltes der Autolysate, namentlich der unter Verflüssigung mit Chloroform gewonnenen, an reduzierenden Zuckern, wegen des mitunter beobachteten Mitgehens von Kupferphosphat auch in den umgeschiedenen Niederschlag und wegen des Anhaftens von Weinsäure an demselben. Die rohe Hefegummi-Kupferverbindung zu wägen, wie es bei J. WARKANY [2] geschah, erscheint bei dem wechselnden und hohen Gehalt der Autolysate an phosphorsauren Salzen als unzulässig. Aus sehr ansehnlichen Niederschlägen, welche die Autolysate mit Fehlingscher Lösung gaben, gingen bei der Reinigung oft nur geringe Mengen von Hefegummi hervor. Die qualitative Prüfung auf Hefegummi kann daher täuschen. Wir lassen der Abscheidung mit Fehlingscher Lösung eine erste Reinigung des Hefegummis durch Fällen der Autolysate mit Alkohol vorangehen und bestimmen schließlich den Hefegummi, der am Ende noch etwas Kupferphosphat enthalten kann, durch Polarisation. Der zugrunde gelegte Wert von $[\alpha]_D^{20} = +80,3^\circ$ war in 2proz. Lösung mit einem reinen Vergleichspräparat in exsiccatortrockenem Zustande [252] (im Hochvakuum bei 56° noch 11% Wasser verlierend) ermittelt, das die Herren H. KRAUT und F. EICHHORN uns aus einer Untersuchung über Hefegummi freundlich zur Verfügung stellten. Unter den angegebenen Mengen ist also exsiccatortrockener Hefegummi zu verstehen.

[1] Chem. Ber. Bd. 27, S. 497 [1894]; Diese Zs. Bd. 61, S. 124 [1909].
[2] Biochem. Zs. Bd. 150, S. 271 [1924].

Für die Analyse dient eine Probe von Autolysat, z. B. 30 ccm, die etwa 20 bis 100 mg Hefegummi enthalten. Noch 2 mg in 10 ccm geben mit Fehlingscher Lösung wie auch mit Alkohol brauchbare Niederschläge, während die mit 1 mg entstehende Trübung nicht mehr ausreicht. Bei der Polarisation entspricht 1 mg noch einem Winkel von ungefähr 0,03°.

Das klare Autolysat wird mit dem 5- bis 6fachen Volumen Alkohol gefällt und einige Stunden stehen gelassen. Den abzentrifugierten Niederschlag ziehen wir im Zentrifugenglas 4mal mit je 5 ccm $^{n}/_{20}$-Essigsäure aus und trennen die Lösung jedesmal mittels der Zentrifuge ab. Die erhaltene reinere Lösung des Hefegummis wird mit 30 ccm Fehlingscher Lösung $^{1}/_{2}$ Stunde auf dem Wasserbad erwärmt und 4 bis 5 Stunden stehen gelassen. Den wieder mit der Zentrifuge isolierten Niederschlag lösen wir in 2 ccm 8proz. Salzsäure und fällen, damit keine Weinsäure anhaftet, den freien Hefegummi mit viel (35 ccm) 95proz. Alkohol. Der Niederschlag wird im Zentrifugenglas einmal mit 15 ccm 95proz. Alkohol gewaschen und mit Wasser in ein 10-ccm-Meßkölbchen übergespült. Eine manchmal auftretende Trübung, die Filtration notwendig macht, ist durch Kupferphosphat hervorgerufen. Für die Polarisation dient eine enge 2-dm-Röhre.

Belege:

20 ccm Autolysat enthielten 0,0512 g Hefegummi.
20 „ Autolysat, mit 40,0 mg Hefegummi versetzt, ergaben 0,0908 g anstatt 0,0912 g.
20 „ „ „ 80,0 „ „ „ „ 0,1320 g „ 0,1312 g.
20 „ „ „ 40,0 „ „ + 100 g Wasser versetzt, ergaben 0,0910 g anstatt 0,0912 g.
20 „ „ „ 80,0 „ „ + 100 g Wasser versetzt, ergaben 0,1310 g anstatt 0,1312 g.
20 „ „ „ 40,0 „ „ versetzt und 14 Tage stehen gelassen, ergaben 0,0908 g anstatt 0,0912 g.

Die Fehler betragen weniger als 1%.

[253] Die gefundenen Werte werden in Gewichtsprozenten der Trockenhefen und der Trockengewichte von Autolysaten oder Präparaten ausgedrückt. Um die Hefegummigehalte mit den Invertinwerten in Beziehung zu setzen, ist es am zweckmäßigsten, die auf 1 Saccharaseeinheit treffenden Mengen Hefegummi anzugeben, also den Quotienten $\frac{\text{mg Hefegummi}}{\text{Zahl der S.E.}}$. Es sei erinnert, daß 1 S.E. in 10 mg eines guten Invertinpräparates enthalten ist, nämlich eines Präparates vom Zeitwert 0,2 oder Saccharasewert 5.

2. *Gehalt der Hefen.*

Vergleichende Bestimmungen in Bierhefe vor und nach der Anreicherung des Invertins aufs 12fache ergaben gleiche Gehalte an Hefegummi, nämlich 8%. SALKOWSKI hat in obergäriger Hefe 6,9% gefunden. Das Verhältnis des Invertins zum Hefegummi verbessert sich also in demselben Maße, wie der Invertingehalt wächst, im Beispiel der Tab. 1 von etwa 1100 auf 94 mg pro 1 S.E.

Tabelle 1. Hefegummi in invertinarmer und invertinreicher Hefe.
(Angew. Hefestamm Rc 12/V.)

Nr.	Zeitwert der Hefe vor der Führung	Zeitwert der Hefe nach der Führung	Hefegummi-Bestimmung Angew. Trockeng. g	Hefegummi-Bestimmung Abgel. Winkel α	Hefegummi Proz. des Trockengewichts	Hefegummi auf 1 S.E. mg
1a	278	—	1,122	2,90	8,0	1110
1b	278	—	1,122	2,92	8,1	1112
1c	278 (6 Tg. i. Eisschr.)	—	1,122	2,90	8,0	1110
2a	278	23	1,075	2,85	8,1	93,0
2b	278	23	1,075	2,89	8,2	94,9

3. Gehalt der Autolysate aus gewöhnlicher Hefe.

Über die Hefegummigehalte der Autolysate liegen nur einige vorläufige Angaben von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[1] [254] vor, ermittelt nach der für diesen Zweck nicht zuverlässigen Methode von SALKOWSKI. Sie bestätigten die Beobachtungen von SALKOWSKI, wonach durch Autolyse bei Gegenwart von Chloroform gummiarmes Invertin gewonnen wird. Dieses gilt indessen nur für den Fall, daß die Freilegung des Enzyms mit geringer Ausbeute erfolgt, z. B. (bei WILLSTÄTTER und RACKE) bis zu einem Drittel. Bei vollständiger Freilegung des Invertins holt der Hefegummigehalt (Vers. 2 und 3 der Tab. 2) den mit anderen Zellgiften dargestellter Autolysate ein.

Die Invertinlösungen waren (nach Abh. I, S. 53) durch Versetzen der Hefe mit Wasser und Zellgift gewonnen (Vers. 1 und 2 der Tab. 2) oder durch Verflüssigung der unverdünnten Hefe, darauffolgende Neutralisation und entweder bei Zimmertemperatur (nach Abh. VIII, S. 272; Vers. 3 der Tab. 2) oder bei 30° fortgesetzte Autolyse (Vers. 4 und 5 der Tab. 2) und zwar in allen Fällen mit hoher Ausbeute. Die Hefegummimenge, 4 bis 7 % des Autolysattrockenrückstandes, bewegte sich zwischen 213 und 342 mg auf 1 S.E. Das Verhältnis ist also 4mal günstiger als in der Hefe selbst.

Tabelle 2. Hefegummi in Autolysaten aus gewöhnlicher Hefe.

Nr.	Art der Autolyse	Zeitwert der Hefe	Zeitwert des Autolys.	Hefegummi-Bestimmung Angew. Trockeng. g	Hefegummi-Bestimmung Abgel. Winkel α	Hefegummi Proz. des Trocken-gew.	Hefegummi Proz. der angew. Trockenhefe	Hefegummi auf 1 S.E. mg
1	Tol. sauer, ohne Verfl., bei 18°	284	98	0,900	1,98	6,8	2,35	333
2	Chlorof. sauer, ohne Verfl., b. 18°	284	98	0,745	1,67	6,9	2,32	338
3	Chlorof. neutr., Verfl., bei 18°	208	78	0,525	1,04	6,2	1,98	242
4	Toluol neutral, Verfl., bei 30°	208	112	0,840	1,01	3,8	2,01	213
5	dgl.	284	950	0,640	1,16	5,7	1,91	270

4. Gehalt der Autolysate aus invertinreichen Hefen.

Die Verarbeitung der Hefen nach Invertinanreicherung ergab Autolysate von günstiger Zusammensetzung. Der [255] Hefegummigehalt, bezogen auf 1 S.E., betrug nämlich zwischen 98 und 26 mg (Tab. 3). Für die Freilegung des Invertins wurden folgende Verfahren angewendet:

[1] Abh. I, Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 51.

1. Autolyse durch Einw. von Zellgift auf die mit Wasser verd. Hefe, ohne Neutr., bei Zimmertemperatur.

2. Verflüssigung der unverd. Hefe durch Chloroform und Autolyse unter Neutr., bei Zimmertemperatur.

3. Verflüssigung der unverd. Hefe durch Toluol bei 30° oder 35°, Autolyse unter Neutr. bei Zimmertemperatur.

4. Verflüssigung der unverd. Hefe bei 30° oder 35°, Autolyse unter Neutr. bei 30° oder 35°.

5. Ebenso, indessen ohne Neutralisation.

Tabelle 3. Hefegummi in Autolysaten invertinreicher Hefen.

Nr.	Art der Autolyse	Zeitwert der Hefe	Zeitwert des Autolys.	Hefegummi-Bestimmung Angew. Trockeng. g	Hefegummi-Bestimmung Abgel. Winkel α	Hefegummi Proz. des Trockengew.	Hefegummi Proz. der angew. Trockenhefe	Hefegummi auf 1 S.E. mg
1	Verf. 1, Toluol	52	21	0,800	1,48	5,8	2,27	60,8
2	„ 1, Chloroform	52	28	0,910	1,56	5,4	2,65	75,6
3	„ 2	47,8	20	0,605	1,02	5,3	1,95	53,0
4	„ 2	32,5	18,5	0,540	0,97	5,6	1,90	51,8
5	„ 3, bei 35	35	16,3	0,720	1,45	6,3	2,93	51,2
6	„ 3, bei 30	35	17,5	0,785	1,51	6,1	2,93	53,3
7	„ 3, bei 30	28	14,4	0,870	1,78	6,4	3,20	46,1
8	„ 3, bei 35	37	21,6	0,940	1,78	5,9	3,42	63,9
9	„ 4, Toluol bei 30°	47,8	20	0,585	1,43	7,7	2,87	77,0
10	„ 4, Toluol-Essigester bei 30°	52	25,8	0,895	2,18	7,6	3,68	98,6
11	„ 4, Toluol bei 30	32,5	20	0,560	0,99	5,6	2,66	56,0
12	„ 5, Toluol bei 35	37	10,2	0,690	1,37	6,2	3,20	59,7
13	„ 5, Toluol bei 30	28	12,8	0,580	1,04	5,6	2,48	35,8
14	„ 5, Toluol bei 30	19,8	12,3	0,490	0,92	5,8	3,27	35,6
15	„ 5, Toluol bei 30	22	10,5	0,590	0,92	4,8	2,30	25,4

In den Verlauf der Autolyse gewährt die Untersuchung einer Reihe von Proben einigen Einblick. Die Verflüssigung der Hefe vom Zeitwert 25,4 wurde unverdünnt mit Toluol bei [256] 30°, und nach dem Verdünnen mit dem gleichen Gewicht Wasser die Autolyse unter Neutralisation bei derselben Temperatur vorgenommen. Die Freilegung des Invertins war in 10 Stunden beendet. Darüber hinaus beobachteten wir die Autolyse noch weitere 24 Stunden, in einem Teil bei 30°, in einem anderen bei Zimmertemperatur. Das Gewichtsverhältnis des Invertins zu seinen Begleitstoffen ist, wie aus der Tab. 4 hervorgeht, zu Anfang, während und nach der Hefeverflüssigung ungünstig und es verschlechtert sich wieder nach beendeter Invertinfreilegung, da eben dann nur noch Fremdkörper in die Invertinlösung übergehen können.

Tabelle 4. Beobachtung des Autolysenverlaufs. (Zeitwert der angewendeten Hefe: 25,4.)

Nr.		Invertinausbeute in Proz.	Zeitwert des Auszugs	Trockengewicht in Proz. der Trockenhefe	Hefegummi Proz. des Trockengew.	Hefegummi Proz. der angew. Trockenhefe	Hefegummi auf 1 S.E. mg
1	Probe I (sofort nach Verflüssigung)	3,9	131,0	**20,1**	1,75	0,35	115,0
2	Probe II (nach $5^1/_2$ Stunden)	69,0	14,5	36,3	6,10	2,41	44,3
3	Probe III (nach 10 Stunden)	97,0	11,7	**44,3**	6,00	2,69	35,2
4	Probe IV (12 Stunden nach beend. Inv.-Freilegung)	101	12,2	50,2	6,40	3,06	39,0
5a	Probe Va (24 Stunden nach beend. Inv.-Freilegung)	102	15,1	63,0	6,30	3,75	47,5
5b	Probe Vb (wie Va, jedoch bei Zimmertemperatur)	101	14,2	57,0	6,20	3,46	44,0

Eine Verbesserung der enzymatischen Konzentration in den Autolysaten war daher zu erwarten, wenn wir die Hefe nach vollständiger Verflüssigung von der ausgetretenen Flüssigkeit, dem Verflüssigungssaft, trennten und von neuem mit Toluolwasser von 30° zur Freilegung des Invertins ansetzten. Unter diesen Umständen tritt im Laufe der weiteren Autolyse [257] sehr wenig Säure auf, so daß es zwischen Autolysat mit und ohne Neutralisation kaum einen Unterschied gibt. Das Verfahren der Fraktionierung ergibt gemäß den Beispielen der Tab. 5 bei sehr guten Zeitwerten der Autolysate (nämlich 4 bis 2,5) für die Hefegummimengen auf 1 S.E. Werte von nur etwa 8 mg, die 30fach günstiger sind als die in den bisher dargestellten Autolysaten aus gewöhnlicher Hefe.

Tabelle 5. Hefegummi bei fraktionierter Autolyse invertinreicher Hefen.

Nr.	Art der Autolyse	Zeitwert		Hefegummi-Bestimmung		Hefegummi		
		der Hefe	des Autolys.	Angew. Trockengewicht g	Abgelesener Winkel α	Proz. des Trockengewichts	Proz. der angew. Trockenhefe	auf 1 S.E. mg
1	Toluol, neutr., bei 30°	20,8	2,5	0,164	0,18	3,4	0,37	4,26
2	Toluol, sauer, bei 30°	21,0	4,2	0,094	0,12	4,2	0,85	8,95
3	dgl.	17,7	3,6	0,136	0,18	4,1	0,79	7,41
4	dgl.	23,0	4,6	0,137	0,16	3,6	0,72	8,29
5	dgl.	19,8	4,3	0,165	0,21	4,0	0,80	8,60
6	dgl.	22,0	3,6	0,190	0,27	4,5	0,74	8,10

Wenn die unter Fraktionierung gewonnenen Autolysate durch Dialyse gereinigt werden, so steigt der Hefegummigehalt, auf Trockengewicht bezogen, bei nur 4- bis 5facher Verbesserung des Invertinzeitwertes auf 15 bis 16% an, während ein nach früheren Methoden (Autolyse bei saurer Reaktion) aus gewöhnlicher Hefe gewonnenes Autolysat durch Dialyse einen 12fach besseren Zeitwert erreicht und dann einen Gehalt von etwa 80% Hefegummi aufweist.

An den Hefegummimengen, die bei der fraktionierten Autolyse in Lösung übergehen, zeigt sich eine eigentümliche Erscheinung, die für den Vorteil der neuen Methode der Invertinfreilegung mit verantwortlich ist. Wird die Hefe nach vollständiger Verflüssigung durch das Zellgift vom [258] Verflüssigungssaft getrennt und dann weiter autolysiert, so tritt im ganzen viel weniger Hefegummi aus dem Pilze aus, als wenn die Autolyse ohne Abtrennung des Verflüssigungssaftes durchgeführt wird. In letzterem Falle beträgt der Hefegummi im Autolysat 1,9 bis 3,6% vom Hefetrockengewicht, hingegen ist beim Verarbeiten der nämlichen Hefe die Summe der Hefegummimengen des Verflüssigungssaftes und des Autolysats 1 bis 1,3% der Trockenhefe (1,01, 1,05, 1,12, 1,27); davon befindet sich etwa 1/3 im abgetrennten Verflüssigungssaft. Läßt man diese Flüssigkeit auf die nach beendeter Freilegung des Invertins abgetrennten Heferückstände von neuem einwirken, z. B. so lange, als die Autolyse zu dauern pflegt, so geht wieder Hefegummi in Lösung und zwar die nach jener Differenz zu erwartende Menge, während dieses beim Ansetzen der Heferückstände mit Wasser oder angesäuertem Wasser nicht geschieht. Durch Aufkochen wird der Verflüssigungssaft

nicht wirkungslos, aber die Wirkung wird vermindert (statt 17 mg wurden nach Aufkochen nur 10,9 mg Hefegummi in 26 Stunden in Lösung übergeführt, dagegen durch Wasser oder säurehaltiges Wasser nur 1,5 mg).

B. Tryptophan.

Nachdem eine Untersuchung von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] vor kurzem die Aufmerksamkeit auf den Tryptophangehalt des Invertins gelenkt, zeigte unsere VIII. Abhandlung, daß Tryptophanpeptid nicht anders als Hefegummi zu den Fremdkörpern zählt, die sich in buntem Wechsel mit dem Enzym vergesellschaften. Es vermag aber aufs hartnäckigste dem Invertin anzuhaften und ihm durch die verschiedenen Adsorptionsvornahmen zu folgen, so daß z. B. das beste von den bisher beschriebenen Präparaten nach allen und zwar sehr zahlreichen Adsorptionsvorgängen noch 9 % Tryptophan aufwies.

Im folgenden beginnen wir, das Tryptophan in den Hefen vor und nach der Anreicherung des Enzyms und in den nach [259] alten und neuen Methoden gewonnenen Autolysaten zu beobachten. Die Verbesserung der Methode führt nun dazu, daß ohne irgend eine weitere Reinigung das Invertin schon in dem dialysierten Autolysat nur halb so viel Tryptophan mitführt, als in dem erwähnten Präparat vom Zeitwert 0,15 (S.W. 6,67), in dem auf 1 S.E. 0,67 mg Tryptophan treffen. Es ist, ähnlich wie beim Hefegummi, zweckmäßig, den Gehalt an Tryptophan in Milligrammen, bezogen auf 1 S.E., anzugeben.

Die Tryptophanbestimmungen führen wir gemäß dem Vorbild der Arbeit von H. v. EULER und K. JOSEPHSON nach der Bestimmungsweise von O. v. FÜRTH und F. LIEBEN[1]) aus. Die Hefe wird für die Analyse so wie bei der Hefegummibestimmung durch Aufkochen mit der 20fachen Menge 3proz. Natronlauge vollständig in Lösung übergeführt, die man mit 10proz. Salzsäure neutralisiert, und zwar aus der Bürette, um die Volumvermehrung der Lösung genau zu kennen. 2 ccm der Lösung dienen dann für die Bestimmung. Die Flüssigkeit wird beim Neutralisieren farblos, so daß sie ohne weiteres für die Farbreaktion anwendbar ist. Die Autolysate müssen hingegen mit Tierkohle entfärbt werden.

Gewöhnliche Bierhefe und eine 12 mal invertinreichere wiesen (Tab. 6) gleichen Tryptophangehalt auf, nämlich 1,1 bis 1,2 % des Trockengewichtes. Das Verhältnis Tryptophan zu 1 S.E. verbessert sich also in dem Maße des Invertinzuwachses, von 150 auf 13 mg.

Tabelle 6. Tryptophan in gewöhnlicher und in invertinreicher Hefe.

Nr.	Zeitwert der Hefe vor der Führung	Zeitwert der Hefe nach der Führung	Tryptophan Proz. des Trockengew.	Tryptophan auf 1 SE. mg
1a	261	—	1,17	152,5
1b	261	—	1,14	140,0
2a	165	22	1,20	13,2
2b	165	22	1,14	12,6

[1] Chem. Ber. Bd. 57, S. 859 [1924].

[1]) Biochem Zs. Bd. 109, S. 124 [1920].

[260] Die üblichen Verfahren der Invertinfreilegung holen mit dem gesamten Enzym die Hälfte des Tryptophans aus der Hefe heraus, aus gewöhnlicher und aus invertinreicher. Demgegenüber erzielen wir mit der gebrochenen Autolyse eine Verbesserung, wie die Tab. 7 erkennen läßt. Mit allem Invertin geht nur etwa $^1/_4$ des Tryptophans in Lösung, 2,3 bis 3,5 mg auf 1 S.E., der Quotient $\frac{\text{Tryptophan}}{\text{S.E.}}$ wird also 50mal günstiger, als in gewöhnlicher Bierhefe.

Tabelle 7. Tryptophangehalt der Hefeautolysate.

Nr.	Art der Autolyse	Zeitwert		Tryptophan		
		der Hefe	des Autolys.	Proz. des Trockengew.	Proz. der angew. Trockenhefe	auf 1 S.E. mg
1	Tol., sauer, ohne Verfl., bei 18°	261	142	0,96	0,52	68
2	dgl.	230	117	1,30	0,66	76
3a	Tol., sauer, Verfl., bei 30°	19,8	12,3	1,04	0,59	6,4
3b	Tol., sauer, Verfl., frakt., bei 30°	19,8	4,3	1,08	0,23	2,3
4a	Tol., sauer, Verfl., bei 30°	20,2	10,3	1,05	0,49	5,4
4b	Tol., sauer, Verfl., frakt., bei 30°	20,2	4,9	1,00	0,23	2,4
5a	Tol., sauer, Verfl., bei 30°	22,0	10,5	1,27	0,60	6,6
5b	Tol., sauer, Verfl., frakt., bei 30°	22,0	3,6	1,07	0,32	3,5
6	dgl.	23,0	4,6	1,34	0,26	3,0
7	dgl.	23,6	4,4	1,17	0,20	2,6

Tryptophan aus 100 g wasserfreier Hefe.

Hefe, Zeitwert	Autol., Tol., sauer, Verfl., bei 30°	Ebenso, frakt. Autol.		
		Verfl.-Saft	Autolysat	Summe
22,0	0,60 g	0,035 g	0,32 g	0,355 g
20,2	0,49 g	0,028 g	0,23 g	0,258 g

Bei der fraktionierten Autolyse bleibt nicht nur die Menge des in die Invertinlösung gehenden Tryptophans zurück hinter [261] der Menge in üblichen Autolysaten; es ist sogar wie beim Hefegummi die Summe des Tryptophans im Verflüssigungssaft und in der Invertinlösung niedriger als in dem ohne Fraktionierung durchgeführten Parallelversuch.

Der Tryptophan-Invertinquotient der Autolysate verbessert sich (Tab. 8) bei der Dialyse, während dabei der Hefegummigehalt des Invertins unverändert bleibt. Ein Autolysat, aus gewöhnlicher Hefe nach den alten Methoden gewonnen, verlor in der Dialyse mehr als 90% vom Tryptophan. Auch beim verhältnismäßig tryptophanarmen Invertin aus der fraktionierten Autolyse invertinreicher Hefen sank der Quotient auf $^1/_3$ bis $^1/_{10}$. Den günstigsten Wert, 0,34 mg auf 1 S.E., erreichte ein dialysiertes Autolysat vom Invertinzeitwert 0,55. In diesem Fall ist das bei invertinreicher Hefe schon sehr günstige Verhältnis von Tryptophan zu Invertin noch 35mal besser als in der Hefe. Die Dialyse ist in diesem Versuch (Nr. 4 der Tab. 8) nach 14 Tagen abgebrochen worden, gewiß ohne daß sie beendet war. In den anderen Versuchen der Tabelle schloß sich an 8tägige Dialyse mit langsam strömendem destilliertem Wasser noch eine 3- bis 4stündige Elektrodialyse an.

Tabelle 8. Abnahme des Tryptophans bei der Dialyse roher Invertinlösungen.

Nr.	Art der Autolyse	Vor der Dialyse			Nach der Dialyse		
		Zeitwert des Autolys.	Tryptophangehalt		Zeitwert des Autolys.	Tryptophangehalt	
			Proz. des Trockengewichts	auf 1 S.E. mg		Proz. des Trockengewichts	auf 1 S.E. mg
1	Tol., sauer, ohne Verfl., b. 18°	117	1,30	76	0,8	1,12	5,50
2	Tol., sauer, Verfl., frakt., b. 30°	4,9	1,00	2,4	0,05	1,52	0,72
3	dgl.	3,9	—	(ca. 3)	0,08	1,81	0,88
4	dgl.	2,6		(ca. 3)	0,55	1,23	0,34

[262] C. Invertin aus der fraktionierten Entleerung der Hefe.

Auf invertinreiche Hefe wird die Methode der II. Abhandlung[1] übertragen, die Hefe nach Abtötung ihrer Freilegungsenzyme proteolytisch zu entleeren unter Erhaltung ihres Invertingehaltes und dann das Invertin durch diastatische Einwirkung in Freiheit zu setzen. Das merkwürdige Experiment verläuft mit Hefe von 14fach höherem Invertingehalt ganz ebenso wie in der Beschreibung von WILLSTÄTTER und RACKE. Die am Ende erhaltene Hefeauflösung ist Invertin vom Zeitwert 2,7; die enzymatische Konzentration ist also nicht größer als bei der einfachen neuen Methode der fraktionierten Selbstauflösung, weil nämlich die Diastase sehr viel Hefegummi in Lösung bringt. Die Menge Hefegummi auf 1 S.E. beträgt 57 mg. Aber die rohe Invertinlösung ist arm an Eiweißspaltungsprodukten, so daß das Verhältnis Tryptophan auf 1 S.E. (0,51 mg) ohne weiteres besonders günstig ist. Diese Menge auf 1 S.E. ist um ein Drittel geringer als in dem Invertinpräparat vom Zeitwert 0,15, in dem die Adsorptionsmethode das Ende ihres Leistungsvermögens erreicht hatte. Der Tryptophangehalt ging aber dann bei einer Dialyse von 21 Tagen nur auf 0,48 mg pro 1 S.E. zurück; die Lösung ist eben frei von Protease und sie enthält das Tryptophan in schwer dialysierbarer, hochmolekularer Form.

Während die analytischen Daten bei derartig fraktionierter Entleerung von gewöhnlicher Hefe wenig Bemerkenswertes ergaben (Tryptophangehalt 8,61 mg auf 1 S.E.), bot die Analyse (Tab. 9) beim Versuch mit invertinreicher Hefe eine bemerkenswerte Ergänzung des in der II. Abhandlung beschriebenen Experimentes.

Das Ausgangsmaterial, 140 g abgepreßte Hefe von 23% Trockengewicht, enthielt 30,6 S.E. gemäß ihrem Zeitwerte 21. Die Abtötung durch Essigester bei 37° während $1^1/_2$ Stunden verlief so, daß die Heferückstände kein Invertin mehr ohne Hilfe fremder Enzyme in Lösung schicken konnten. Der [263] Verflüssigungssaft enthielt sehr wenig Invertin, Hefegummi und Tryptophan. Die Entleerung durch Pepsin in 9tägiger Einwirkung bei 30° verlief mit geringem Invertinverlust, während dabei an Tryptophan $^3/_4$% des ursprünglichen Hefetrockengewichtes in Lösung gingen, also etwas mehr als sonst zusammen mit allem Invertin. Die letzte Phase des Experimentes war die Behandlung ($7^1/_2$ Tage, 30°) der Heferückstände mit gereinigter Malzamylase. Dabei entstand eine Auflösung mit fast allem Invertin (28,6 E.) und mit viel Hefegummi (1,4240 g), aber nur (höchstens) 0,0131 g Tryptophan.

[1] R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Ann. d. Chem. Bd. 427, S. 111 [1921].

Tabelle 9. Verlauf der fraktionierten Entleerung invertinreicher Hefe.
(140 g Hefe: Zeitwert 21, Trockengew. 23 %, 30,6 S.E.)

		Verflüss.-Saft	Proteolyt. Auszug	Diastat. Auszug
In Lösung gegangene Trockensubstanz (g)		5,97	11,7	3,40
Gelöstes Invertin; Zeitwert		0,30 S.E.; 390	0,475 S.E.; 493	28,6 S.E.; 2,71
Hefegummi	in Lösung gegangen (g)	0,0221	0,1960	1,424
	Proz. der ang. Trockenhefe	0,068	0,61	5,2
	auf 1 S.E. (mg)	72,1	413	56,8
Tryptophan	in Lösung gegangen (g)	0,0084	0,239	0,0131
	Proz. der ang. Trockenhefe	0,026	0,75	0,047
	auf 1 S.E. (mg)	27,3	504	0,51

D. Phosphor.

In den letzten Jahren war die Frage strittig, ob Invertin eine Phosphorverbindung sei. R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN[1] gelangten aber durch weitgehende Reinigung zu Invertinpräparaten n_1, p und l (Zeitwerte: 0,50, 0,29, 0,20) [264] von nur 0,006, 0,02 und 0,027 % Phosphorgehalt. Hier trafen auf 1 S.E., das ist 10 mg vom Zeitwert 0,20, nur 0,0015, 0,0029 und 0,0027 mg Phosphor. In gewöhnlicher Hefe fanden wir[1]) dagegen auf 1 S.E. die 100000fache Menge Phosphor (2,25 %). Der Phosphorgehalt ändert sich merkwürdigerweise gar nicht bei unserer Gärführung mit niedriger Zuckerkonzentration und bei Gegenwart von viel Phosphat. Die sehr invertinreich gewordene Hefe enthielt ebenfalls 2,28 % Phosphor. Von dieser Phosphormenge begleitet ein großer Teil das Invertin in die Autolysate. Diese werden bis zum Verschwinden der Reaktion mit Kleinmannschem[2]) salzsaurem Strychnin-Molybdatreagens dialysiert und elektrodialysiert. Danach enthielt die Invertinlösung noch 0,1 % des Trockenrückstandes an Phosphor. Dies ist bei Invertin aus invertinarmer und invertinreicher Hefe 0,7 bzw. 0,06 mg, auf 1 S.E. bezogen, also $^1/_{400}$ der ursprünglichen Phosphormenge.

	P_2O_5		P	
	Proz. des Trockengewichts	auf 1 S.E. mg	Proz. des Trockengewichts	auf 1 S.E. mg
a) Gewöhnliche Hefe	5,11	670,0	2,25	294,0
b) Invertinreiche Hefe	5,18	56,8	2,28	25,1
c) Dial. Autol. aus a)	0,32	1,570	0,14	0,6880
d) Dial. Autol. aus b)	0,27	0,134	0,12	0,0588

a) 0,2400 g gew. Hefe vom Zeitwert 261 gaben 0,3682 g Molybdat.

b) 0,2430 g „ „ „ „ 22 „ 0,3785 g „

c) Hudson-Autol. aus gew. Hefe v. Zeitw. 117. Dialysat v. Zeitw. 9,8; 0,1050 g Trockenrückst. entspr. 0,0187 g Molybdat.

d) Frakt. Autol. invertinreich. Hefe v. Zeitw. 3,9. Dialysat v. Zeitw. 0,98; 0,0898 g Trockenrückst. entspr. 0,0074 g Molybdat.

---

[1] III. Abh., Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922].

[1]) H. v. EULER und P. LINDNER führen in der „Chemie der Hefe" (Leipzig 1915) die Analyse von F. SCHÖNFELD an, der in verschiedenen Hefen 1,95 bis 2,52 % Phosphor findet.

[2]) H. KLEINMANN, Biochem. Zs. Bd. 99, S. 150, und zwar S. 174 [1919].

II. Verfahren der fraktionierten Autolyse.

Unsere Abhandlungen I und II zur Kenntnis des Invertins stellten das Ziel der präparativen Methode auf, den [265] enzymatischen Vorgang der Invertinfreilegung von der allgemeinen Selbstauflösung der Hefe zu trennen und so zu leiten, daß das Invertin vollständig in Lösung geht zusammen mit möglichst wenig von anderen Inhaltsstoffen der Hefe. Die Verbesserung der enzymatischen Konzentration beim Übergang des Enzyms vom Pilz in das Autolysat drückt sich im Steigen des Saccharasewertes aus oder im Sinken des reziproken Invertinzeitwertes, der bei dem verdünnten Material ein anschaulicheres Maß ist.

1. Das Verfahren (I. Abh., S. 53) der Autolyse bei Zimmertemperatur durch Einwirkung von Toluol auf die mit gleichem oder doppeltem Gewicht Wasser verdünnte Hefe ergab in 4 bis 7 Tagen Invertinlösungen, deren Konzentration doppelt so groß war wie in der Hefe; aus Hefen vom Zeitwert 350 bis 230 Autolysate vom Zeitwert 206 bis 160.

2. Das ähnliche Verfahren (I. Abh., S. 54) unter Neutralisieren der auftretenden Säure führte in 3 bis 4 Tagen zu Autolysaten von fast dreifacher Konzentration im Vergleich zur Trockenhefe; Zeitwert 142 bis 114.

3. Das Verfahren der raschen Autolyse bei neutraler Reaktion (VIII. Abh., S. 266) bestand in der Einwirkung von Chloroform auf unverdünnte Hefe, Verdünnen und Neutralisieren erst nach der Verflüssigung und Autolyse in 1 bis 2 Tagen. Die Autolysate haben bei 90% Ausbeute ungefähr dreimal günstigere Zeitwerte als die Trockenhefe; Hefen 315 und 264, Autolysate 99 und 86.

Eine wesentliche Verbesserung dieser Reinheitsgrade ermöglichte die Verarbeitung von Hefe, deren Invertingehalt durch geeignete Gärführung gesteigert worden ist. Von dem bisherigen Stand der Methode gibt die neue Monographie von O. SVANBERG[1] (Stockholm) eine Darstellung, wonach aus invertinreicher Hefe vom Zeitwert 90 während mehrerer Wochen Autolysensäfte vom Zeitwert 45 (S.W. = 0,022) entstehen.

Auf unsere in der vorangehenden Abhandlung [266] beschriebenen invertinreichen Hefen (Zeitwert ungefähr 20; S.W. 0,05) war das dritte Verfahren nicht mit gleichmäßigem Erfolg anwendbar. Hefen, die sich vor der zur Verbesserung des Invertingehaltes dienenden Gärführung rasch und mit guter Ausbeute autolysieren ließen, erlitten des öfteren, wenn sie invertinreich geworden, durch Behandeln in unverdünntem Zustand mit Chloroform und im Verlauf der Neutralautolyse eine Schädigung des Freilegungsenzyms. Die Ausbeute an Invertin erreichte in einer Anzahl von Beispielen nur 50 bis 70%.

Der Verlauf war gleichmäßiger mit Toluol und die Dauer der Autolyse ließ sich durch Verflüssigung der unverdünnten Hefe bei 30° und Autolyse bei derselben Temperatur abkürzen. Da bei der Abtötung der Hefe ein an Invertin armer, an Hefe-

[1] E. Abderhaldens „Handb. der biologischen Arbeitsmethoden", Abt. IV, Teil 1, Heft 2, Lieferung 154 [1925], und zwar S. 258.

gummi und anderen Fremdkörpern verhältnismäßig reicher Saft austrat (vgl. den analytischen Abschnitt I), wurde der Reinheitsgrad der Autolysate durch Abtrennung der Hefe vom Verflüssigkeitssaft und Wiederansetzen mit Wasser und Toluol verbessert. Dies ist das Verfahren der vorliegenden Arbeit. Die Dauer der Verflüssigung beträgt etwa 45 Minuten, die Dauer der Autolyse nach derselben, von einer Hefeprobe zur andern wechselnd, 6 bis 24 Stunden. Ohne Abtrennung erreichen wir mit Hefen vom Zeitwert ungefähr 20 zunächst Autolysate vom Zeitwert 12 bis 8, nach dem neuen Verfahren der gebrochenen oder fraktionierten Freilegung aber solche vom Zeitwert 5 bis 2,5 (S.W. 0,2 bis 0,4). Gegenüber unseren früheren Verfahren wird also die enzymatische Konzentration der rohen Invertinlösungen auf das 30- bis 50fache gesteigert und die Zahl der Saccharaseeinheiten in einem bestimmten Volumen Autolysat aufs 10fache (etwa 10 S.E. in 100 ccm).

Es ist eine eigentümliche Erscheinung bei der Abtrennung des Verflüssigungssaftes, der viel freie Säure enthält (z. B. sind für 1 kg Hefe 20 ccm 10proz. Ammoniak zur Neutralisation erforderlich), daß danach von der Hefemasse nur noch wenig oder keine Säure mehr gebildet und abgegeben wird, während die im Verflüssigungssaft der Autolyse unterliegende Hefe in langer Zeitdauer allerdings in immer schwächerem Maße Säure produziert. Bei dem neuen Verfahren verschwindet der [267] Unterschied zwischen Autolyse bei saurer Reaktion und bei neutraler Reaktion.

Die Autolysate enthalten Hefeeiweiß in geschontem Zustand, indessen viel weniger als beim Verfahren der VIII. Abhandlung. Um von vornherein die Autolysate reiner zu erhalten, säuern wir sie vor dem Abtrennen von den Heferückständen ein wenig an und befreien sie dadurch ohne eine besondere Filtration fast ganz von Eiweiß.

Tabelle 10. Gebrochene Freilegung des Invertins mit Toluol bei 30°.

Nr.	Zeitwert der Ausgangshefe	Abgetr. Inv., Proz. vom angew. Hefeinvertin	Zeitwert der Abtr.-Flüssigkeit	Dauer der Autolyse in Stunden	Ausbeute in Proz. v. angew. Hefeinvertin	Zeitwert des Autolysates
1	15,0	7,6	–	3	27	
				25	70	3,0
2	17,7	5,6	48,5	8	55	
				16	94	3,6
3	19,4	13,8	30,5	5,5	81	
				7	88	2,6
4	20,8	4,3	87	6,5	91	2,5
5	22,0	2,6	110	7,5	75	
				10	100	4,3
6	22,0	23	14,1	5,5	62	
				13	100	3,6
7	23,0	4,6	86	5,5	63	
				9,5	100	4,6
8	23,9	7,7	—	6	54	
				10	98	3,9

Beispiel: 340 g invertinreiche Hefe, die abgepreßt 23,5 % Trockengewicht hatte, enthielten beim Zeitwert 19,4 83 S.E., etwa soviel als 5 kg gewöhnliche Hefe. Die Hefe, vorgewärmt im Thermostaten, verrührten wir bei 30° kräftig mittels eines dicken Glasstabes mit 35 ccm auf 30° erwärmtem Toluol. Die Verflüssigung, die bei Zimmer-

temperatur Stunden erfordern würde, erfolgte in 45 Minuten und zwar so, daß der Brei recht dünnflüssig war. Man verdünnte mit 340 ccm Wasser von 30° **[268]**. Es ist für die Gewinnung eines hochwertigen Autolysates günstig, mit dem Abtrennen noch etwa 1 bis $1^1/_2$ Stunden zu warten. Dann füllten wir zu 1 l auf und trennten mittels der Zentrifuge die Heferückstände ab, die noch mit 1 l Wasser von 30° ausgewaschen wurden. Der abgetrennte Verflüssigungssaft mitsamt dem Waschwasser enthielt in unserem Beispiel 13,8% des angewandten Invertins und 17,4 g Trockensubstanz, d. i. 22% des Hefetrockengewichts, so daß also der Zeitwert dieser ersten Fraktion 30,5 betrug.

Die Heferückstände werden sogleich mit 340 ccm toluolgesättigtem Wasser von 30° unter Zusatz von Toluol aus den Zentrifugenbechern herausgespült. Die Autolyse nimmt im Thermostaten bei 30° ihren Fortgang. Nach beispielsweise 5 und 7 Stunden entnehmen wir, um den zeitlichen Verlauf der Freilegung zu verfolgen, Proben von 5 ccm, die klar filtriert zur Bestimmung des Vergleichszeitwertes[1] angewandt werden. $^1/_2$, später $^1/_4$ ccm reicht dafür. Die entstehende Invertinlösung ist schon bald sehr konzentriert, so daß 50proz. Spaltung der 4,75proz. Rohrzuckerlösung in 10,44 und 9,54 Minuten erreicht wird, also von 1 ccm Invertinlösung, der Definition des Vergleichszeitwertes gemäß in 2,61 und 2,38 Minuten. Die Ausbeuten sind danach, eingerechnet das Invertin der abgetrennten Flüssigkeit, bei idealer Filtration 81 und 88% des angewandten Hefeinvertins.

An diesem Punkt, in anderen Beispielen bei einem etwas späteren, aber unter Vermeidung unnötig langer Dauer, wird die Autolyse abgebrochen. Die Dauer ist also ein Arbeitstag oder ein ganzer Tag. Vor der Isolierung der Lösung wird der dünne Brei zur Beseitigung von etwas gelöstem Eiweiß vorsichtig unter tüchtigem Umrühren mit $^n/_{20}$-Essigsäure angesäuert und zwar bis zur Rotfärbung von Lackmus. Dann säuert man noch etwas mehr an; man stellt nämlich mit Methylrot auf $p_H = 3,5$ bis 4 ein. Dafür waren 220 ccm der Essigsäure erforderlich. Das Autolysat wird mittels der Zentrifuge von den Heferückständen abgetrennt, die wir nicht **[269]** nachwaschen, und, da es etwas trübe ist, durch Einrühren von ein wenig geglühtem Kieselgur geklärt. Nach dem Filtrieren durch große dünne Filter stellt man die Reaktion der Flüssigkeit mit verdünntem Ammoniak wieder auf neutral ein, z. B. auf vollen Umschlag von Bromkresolpurpur.

Das Autolysat, 2,55 l, enthielt 53 S.E., d. i. 85% des in der Hauptfraktion der Autolyse gelösten Invertins und 64% des Gesamtinvertins der angewandten Hefe. Das Trockengewicht betrug 6,72 g, d. i. 8,5% der Trockenhefe. Der Zeitwert des Autolysates war 2,6 (S.W. = 0,385).

Die Invertinlösungen, die das neue Verfahren liefert, sind weit schwächer gefärbt als die früheren, sie sind sehr schwach grünlich, während der abgetrennte Verflüssigungssaft tief gelb ist. Die Millonprobe fällt deutlich aus, nach der Dialyse schwach, aber merkbar.

[1] III. Abh., Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 24.

Über den zeitlichen Verlauf, die Ausbeute und enzymatische Konzentration berichtet die Tab. 10 an einigen weiteren Beispielen.

III. Adsorptionsverhalten des Invertins aus der fraktionierten Autolyse.

Die neuen Hefeauszüge sind ein günstiges Material für die Darstellung von Invertin im Reinheitsgrade von ungefähr S.W. 5. Überraschend leicht gelingt es durch eine einzige Adsorption mit Kaolin ohne Alterung, ohne Alkoholfällung oder andere Vorreinigung ähnlich reine Präparate zu gewinnen wie früher durch Vorreinigung und mehrere Adsorptionsvornahmen. Die Invertinlösungen zeichnen sich auch nach der Reinigung durch Beständigkeit aus. Sie sind durch Begleitstoffe, mit denen sie adsorptiv zusammenhängen, geschützt.

Es scheint, daß solche unter den schärferen Bedingungen der Autolyse (30°) verhältnismäßig reichlicher und rascher entstehen, als z. B. bei dem vorsichtigen Autolyseverfahren der VIII. Abhandlung mit Chloroform bei Zimmertemperatur. Nach dem älteren und dem neuen Verfahren dargestellte Invertinpräparate von demselben Saccharasewert 5 sind von ungleicher Beschaffenheit und Zusammensetzung. In den älteren dürfte [270] das Invertin von mehr anderer Enzymsubstanz begleitet sein als in den neuen, da bei der Enzymvermehrung in der Hefe das Invertin gegenüber den anderen Enzymen stark bevorzugt wird. Bei gleichem Reinheitsgrad wird daher in einem der neuen Präparate ein größerer Anteil von enzymfremden Begleitstoffen enthalten sein. Damit hängt es zusammen, daß die enzymatische Konzentration, während man so leicht etwa zu S.W. 5 gelangt, überraschend schwer weiter zu steigern ist. Die Adsorptionsverfahren, wie sie bisher angewandt wurden, führen mit diesen Invertinpräparaten nicht zu höheren enzymatischen Konzentrationen.

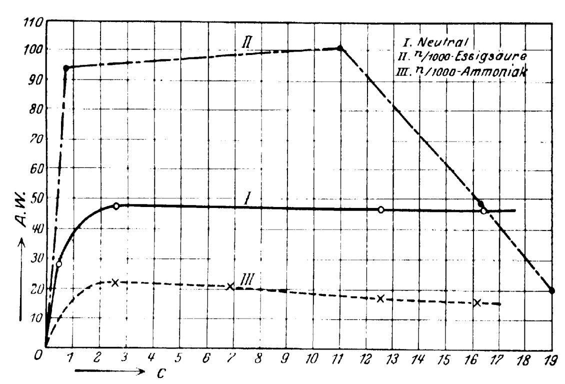
1. Adsorption durch Kaolin.

Aus frischem Autolysat vom Zeitwert 3,6, $^n/_5$-Essigsäure, bei einer Verdünnung von 1 S.E. in $^1/_2$ l, 1 oder 4 l, wurde das Invertin von Kaolin mit dem hohen Adsorptionswert 0,22 aufgenommen. Die Elution mit 0,5proz. Diammonphosphatlösung ergab 77% Ausbeute. Nach der Ausfällung von Phosphorsäure und der Dialyse, die ohne Verlust verlief, besaß das Invertin den Zeitwert 0,177 (S.W. 5,65). Dieser Reinheitsgrad verbesserte sich gar nicht bei einer darauffolgenden Reinigung mit Tonerde. Aus neutraler Lösung in Verdünnung von 1 S.E. in 50 ccm durch Tonerde C zu 80% mit Adsorptionswert 23 adsorbiert und durch 0,5proz. Diammonphosphat eluiert (I. Elution 75%, II. Elution 17% des adsorbierten Invertins), wies das Invertin wieder S.W. 5,56 auf. Der Tryptophangehalt betrug nach der Reinigung mit Kaolin 3,7, nach der mit Tonerde 3,9%. Aus einem anderen Autolysat ging unter denselben Bedingungen Invertin vom S.W. 5,88 hervor, dessen Tryptophangehalt 4,1% betrug.

Mit diesen Erfahrungen steht im Einklang, daß das Präparat vom S.W. 5,65, vor und nach der Tonerdeadsorption geprüft, dieselbe Adsorptionskurve eines annähernd einheitlichen Stoffes ergab (s. Abbildung). Dies ist, wie in der VII.[1] und VIII. Ab-

[1] H. KRAUT und E. WENZEL, Diese Zs. Bd. 142, S. 71 [1925].

handlung erläutert, nicht die Adsorptionsisotherme der [271] Saccharase, sondern die eines enzymhaltigen Fremdstoffes oder adsorptiv verbundenen Gemisches von Fremdstoffen. Erheblich abweichende Adsorptionskurven beobachteten wir mit demselben Präparat in saurer (s. Abbildung, Kurve II) oder in schwach alkalischer



Tonerdeadsorption eines Invertinpräparates (d. Kaolin gereinigt) vom S.W. 5,65 bei verschiedenen Aciditäten (Verd. 1 : 50).

(s. Abbildung, Kurve III) Lösung. Darauf gegründete Versuche, z. B. den Reinheitsgrad durch Voradsorption zu steigern, schlugen fehl. Als durch fraktionierte Adsorption mit Tonerde aus $^{n}/_{1000}$-essigsaurer Lösung 40% des Invertins in 2 Anteilen entfernt wurden, war der Saccharasewert der Restlösung wieder 5,37 und der Tryptophangehalt 4,1%.

2. Alterung der Autolysate.

Obwohl die Invertinlösungen aus der fraktionierten Autolyse arm an proteolytischem Enzym sind, wird auch bei ihnen die Adsorbierbarkeit durch Alterung verbessert. Dies wird schon in wenigen Tagen bei Zimmertemperatur deutlich, viel rascher bei 30°. Wir bewirken das Altern durch beispielsweise eintägiges Erwärmen des toluolhaltigen Autolysates auf 30° im Thermostaten. Von höheren Adsorptionswerten (0,37, 0,44, 0,52) abgesehen, verläuft die Adsorption mit Kaolin nach [272] Alterung ebenso wie mit den ganz frischen Autolysaten. Invertinpräparate vom S.W. 4,76 und 4,35 wurden erhalten, die sich danach durch eine Tonerdeadsorption nur auf 4,70 verbesserten.

3. Dialysate.

Da die nach den bisherigen Verfahren gewonnenen Autolysate das Invertin in sehr unreinem Zustand enthalten, war durch Dialyse oder Elektrodialyse keine wesentliche Reinigung zu erzielen. Anders bei den 30fach reineren Invertinlösungen. Allein durch Dialyse der Autolysate läßt sich dieselbe enzymatische Konzentration (Zeitwert 0,55) erreichen wie in unserer Abhandlung I nach den Adsorptionen mit Tonerde und mit Kaolin.

In den ersten Tagen tritt im Dialysator ein flockiger Niederschlag auf, wovon abfiltriert wird. Später trübt sich die Flüssigkeit nochmals. Die Invertinlösungen werden farblos und geruchlos. Der Tryptophangehalt geht mehr und mehr zurück, z. B. auf 1,23%. Die Millonprobe wird viel schwächer, bleibt aber noch deutlich, der Hefegummigehalt steigt auf 15% an. Der Adsorptionswert von Kaolin ($^n/_5$-Essigsäure, Verdünnung 1 E. in $^1/_2$ l) steigt bis zu einem ähnlich hohen Wert (1,04) wie bei einem guten Invertinpräparat.

In einigen Beispielen lieferten Autolysate vom Zeitwert 3,9 und 4,9 durch 7- bis 8tägige Dialyse aus sogenannten Fischblasen und 3- bis 4stündige Elektrodialyse mit 98% Ausbeute Invertinlösungen vom Zeitwert 0,95 bis 0,98. Ein Autolysat vom Zeitwert 2,6 verbesserte bei 14tägiger Dialyse (ohne Elektrodialyse) mit Verlust von 12% den Zeitwert auf 0,55.

Wenn man das Invertin aus dialysiertem Autolysat, den günstigen Adsorptionswert ausnützend, durch Kaolinadsorption reinigt, so findet man das Enzym weniger geschützt, den Verlust am Kaolin also größer. Ein Dialysat vom Zeitwert 0,95 lieferte mit 67% Ausbeute eine Elution, worin das Enzym den S.W. 5,18 aufwies. Es war frei von Hefegummi, es unterschied sich von den anderen Präparaten dieser Art durch geringen Tryptophangehalt. Das Dialysat enthält nur noch 1,5, das Präparat nach der Kaolinadsorption 0,7 (± 0,2)% Tryptophan.

[273] *4. Anwendung der Tonerdeadsorption.*

An Invertin vom S.W. etwa 5 machte man in der VIII. Abhandlung die Erfahrung, daß es Aggregate von Saccharase mit Fremdstoffen gibt, z. B. mit Tryptophanpeptid, die, obwohl ihre Auflösbarkeit nachgewiesen ist, doch nicht durch auswählende Adsorption mit Tonerde zerlegt werden können. „Damit war das Ende der Nützlichkeit dieses Verfahrens erreicht." Versuche in den voranstehenden Abschnitten haben diese Erfahrung bestätigt. Abänderung der Lösungsverhältnisse, z. B. der Konzentration, der Acidität, Zusatz von Alkohol, der in einer Konzentration von 30% (A.W. 44 gleich wie ohne Alkohol) bei 0° bei raschem Arbeiten ertragen wird, gestalten die Wirkung der Tonerde nicht in höherem Maße selektiv. Nur durch Zusatz von Rohrzucker zur Invertinlösung, mit oder ohne Monokaliumphosphat, erzielten wir in einigen Beispielen bei Adsorption an Tonerde erwähnenswerte Verbesserungen der Reinheitsgrade. Das Verhalten verschiedener Invertinlösungen, die unter gleichen Bedingungen geprüft wurden, war indessen so ungleich, daß nicht eine Methode der auswählenden Adsorption angegeben werden kann, sondern nur einzelne Versuche zu dem Ziele, die adsorptiv zusammenhängenden saccharasehaltigen Gemische aufzulockern.

Adsorption des Invertins aus Rohrzuckerlösung: Ein Autolysat vom Zeitwert 2,5 wurde mit ähnlichem Erfolg wie durch Dialyse mit der Alkoholfällung gereinigt. Dies gelang bei einem an fällbaren Stoffen so armem und schon so reinem Ausgangsmaterial nur bei tiefer Temperatur und nur unter gleichzeitiger Bildung von Tricalciumphosphat, ähnlich wie im Abschnitt II, B der VIII. Abhandlung.

Das so erhaltene Invertin vom Zeitwert 0,68 erreichte, in üblicher Weise mit Tonerde gereinigt, den Zeitwert 0,24 und enthielt 3,7% Tryptophan. Von diesem Präparat lösten wir 6,4 S.E. in 278 ccm Wasser, fügten 330 ccm 20proz. Rohrzuckerlösung und nach Umschütteln sofort 38 ccm Tonerdesuspension (enthaltend 0,114 g Al_2O_3) hinzu. Das Adsorbat wurde so rasch wie möglich mittels der Zentrifuge abgetrennt und mit Diammonphosphat eluiert. Die Tonerde hatte mit A.W. 44 (fast ebenso [274] wie in reiner wäßriger Lösung) gewirkt und 80% des Enzyms aus der Zuckerlösung aufgenommen. Die Elution enthielt 4,70 E., also 93% der adsorbierten Menge. Die Dialyse und Elektrodialyse verlief ohne Verlust. Das Präparat wies den Zeitwert 0,157 (S.W .6,35) und fast unveränderten Tryptophangehalt (3,9%) auf.

Voradsorption in Gegenwart von Rohrzucker und primärem Phosphat: Für diesen Versuch diente ein Präparat von ähnlicher Vorgeschichte, dessen Zeitwert nach der Reinigung mit Tonerde 0,28 und dessen Tryptophangehalt 3,6% war.

6,3 S.E. in 255 ccm wurden mit 3,1 g KH_2PO_4 versetzt. Dann vermischten wir die Enzymlösung mit 315 ccm 20proz. Rohrzuckerlösung und nach Umschütteln sofort mit 60 ccm Suspension von 0,180 g Tonerde. Das entstandene, sofort mit der Zentrifuge abgetrennte Adsorbat enthielt 2,50 E., also 40% der angewandten Menge, die mit A.W. 14 aufgenommen waren. In anderen Beispielen (bei Präparaten nach der Kaolinadsorption vom Zeitwert 0,20) bewirkte dagegen der Zusatz von Rohrzucker und Phosphat weitaus stärkere Erniedrigung des Adsorptionswertes (bei 0° A.W. 2,5).

Nach wiederholtem Waschen des Adsorbates mit viel Wasser wurde durch 150 ccm Diammonphosphatlösung mit fast quantitativer Ausbeute eluiert. Nach der Dialyse und Elektrodialyse lag das Invertin (2,3 S.E.) im höchsten bisher beobachteten Reinheitsgrade vor, **S.W. 8,55** (Zeitwert **0,117 ± 0,02**). Der Tryptophangehalt war auf 8,6% gestiegen, während die Tryptophanmenge, auf 1 S.E. bezogen, fast unverändert geblieben war. Das Präparat ist also, auch von einem unvermeidlichen Gehalt an enzymähnlichem Material abgesehen, noch unrein. Es enthält viel von den Koadsorbentien, deren Gesellschft das Enzym je nach Art und Menge der ihm begegnenden Fremdstoffe wechselt.

Zeitschrift für physiologische Chemie 150, S. 287 [1925].

56. INVERTINVERMINDERUNG IN DER HEFE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und CHARLES D. LOWRY JR.

Elfte Abhandlung zur Kenntnis des Invertins.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. September 1925.)

Theoretischer Teil.

„Da es maltasefreie Saccharomycesarten gibt, die Maltose nicht vergären können (wie Saccharomyces Marxianus, Hansen, und S. exiguus, Hansen), und solche, die doch Maltose vergären, so ist der Unterschied im Fehlen oder Vorhandensein der spezifischen Maltose-Zymase zu suchen.“ Zu dieser Schlußfolgerung führte eine Arbeit von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[1], in der Malzzuckervergärung durch praktisch maltasefreie Brennereihefen, nämlich durch Hefe M des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe und durch zwei dem Handel entnommene aufgefunden wurde. Sie „vergären die Maltose in Zeiten, in denen die Hydrolyse gar keine Rolle spielt“. Diese Folgerung wird von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[2], sowie von H. v. EULER und V. SANDBERG[3] sorgfältig erörtert. Ebenso wie lange vor WILLSTÄTTER und STEIBELT schon H. v. EULER und G. LUNDEQVIST[4] bei ihren Beobachtungen über Malzzuckervergärung durch Hefen mit schwacher [288] Maltasewirkung die Annahme der direkten Biosegärung abgelehnt hatten, so suchen EULER und seine Mitarbeiter von neuem die Erklärung für die angeführte Erscheinung eher in der Unvollkommenheit der Ermittlung von Maltase. Dieses Enzym soll in seinem Verhalten zwischen der Saccharase und den eigentlichen Gärungsenzymen stehen. Die Möglichkeit sei daher in Betracht zu ziehen, daß die Maltase in ihrem gebundenen Zustand wie die Enzyme des Zymasekomplexes durch die bei der Bestimmung angewandten Zellgifte inaktiviert werde. Es ist die Aufgabe einer demnächst zu veröffentlichenden Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und E. BAMANN, die Zuverlässigkeit der Maltasebestimmung zu erhärten und die direkte Maltosegärung noch deutlicher nachzuweisen.

[1] Diese Zs. Bd. 115, S. 211, und zwar S. 234 [1921].
[2] Diese Zs. Bd. 120, S. 42 [1922].
[3] Fermentforschung Bd. 8, S. 232 [1925].
[4] Diese Zs. Bd. 72, S. 97 [1911].

Direkte Vergärung des Rohrzuckers ist noch nicht festgestellt worden. Es gibt invertinfreie Saccharomycesarten, die Saccharose nicht vergären (wie S. apiculatus Reess, S. unisporus Jörgensen, S. Rouxi Boutroux, S. mali Duclauxi Kaiser) und invertinarme Hefen, die doch Saccharose vergären. Dem typischen Vertreter der letzteren Gruppe, Monilia candida, die E. FISCHER und P. LINDNER[1] untersucht haben, reihen H. v. EULER und K. JOSEPHSON den S. Marxianus an. Das Inversionsvermögen des Pilzes ist nach den Bestimmungen dieser Forscher rund 100mal kleiner als bei den untersuchten Kulturhefen. Aus dem angegebenen Inv. $= 4{,}6 \cdot 10^{-14}$ und der Zellenzahl auf 1 g Trockengewicht $= 7 \cdot 10^{10}$ läßt sich mittels der von WILLSTÄTTER, LOWRY und SCHNEIDER[2] aufgestellten Brücke der Zeitwert 18000 und die Halbspaltungszeit von **217** Min. unter den Gärbedingungen berechnen. Da die angegebene Halbgärzeit bei 30° **550** Min. beträgt, so ist das Inversionsvermögen noch zu bedeutend, um eine Analogie zu den maltasefreien Hefen von WILLSTÄTTER und STEIBELT zu erweisen. Auch in einer gründlichen Untersuchung über die Rohrzuckergärung in alkalischer Lösung, also unter Bedingungen verminderter Invertinwirkung, waren **[289]** H. v. EULER und O. SVANBERG[1]) zu dem Schlusse gekommen: „Es ergibt sich also, daß bei der untersuchten Alkalinität die Inversion des Rohrzuckers genügend schnell erfolgt, um zu ermöglichen, daß Rohrzucker ebenso rasch vergoren wird als Glucose bzw. Invertzucker."

Der Invertingehalt gewöhnlicher Hefen, von untergäriger Brauereihefe und obergäriger Brennereihefe, läßt sich durch kurze Einwirkung verdünnter Mineralsäuren (0,15 bis 0,3n-H_2SO_4) oder verdünnter Alkalilaugen (0,05 bis 0,1n-NaOH) herabmindern und zwar zu ähnlichen Werten (Zeitwert 10000 bis 20000) wie dem von EULER und JOSEPHSON für S. Marxianus angegebenen. Die Wirkung trifft das Invertin und läßt wichtige Funktionen der Hefezelle unberührt. Die Gärkraft wird nämlich dabei in manchen Versuchen gar nicht beeinflußt, in anderen Proben wird die Gärgeschwindigkeit um 10 bis 50% vermindert. Der erzielte Effekt würde aber noch nicht genügen, um eine direkte Vergärung des Rohrzuckers zu erweisen, zumal während der Vergärung rasch ein gewisses Wiederansteigen des Invertingehaltes erfolgt. Es wäre darum auch wichtig, um das Verhalten des S. Marxianus besser beurteilen zu können, zu ermitteln, ob nicht bei diesem Pilze im Verlauf der Gärung das Inversionsvermögen doch auch erheblich anwächst. Bei der maltasefreien Hefe tritt dagegen während der Gärung keine nennenswerte Maltasebildung ein.

Unsere Methode, die direkte Vergärung des Rohrzuckers aufzudecken, besteht nun in dem Vergleiche der Gärung und der Spaltung von Rohrzucker durch invertinärmste Hefe in s a u e r e m Medium und zwar bei einem p_H von ungefähr 2. Unter diesen Bedingungen wird die Gärung um 30 bis 50% verlangsamt, die Invertinwirkung aber auf nur etwa 6 bis 14% herabgesetzt. Die Halbspaltungszeit, die bei gewöhnlichen Hefen $3^1/_2$ Minuten, bei unserer invertinreichen Hefe z. B. 15 Sekunden beträgt,

[1] Chem. Ber. Bd. 28, S. 3034 [1895]. [2] Diese Zs. Bd. 146, S. 158 [1925].

[1]) Diese Zs. Bd. 105, S. 187, und zwar S. 210 [1919].

ist nun beispielsweise auf 213 bis 465 Minuten angewachsen. Dabei ändert weder die Verarmung der Hefe an Invertin (vom Zeitwert 20 bis auf 20000) noch die wesentliche Verschlechterung der Inversionsbedingungen den Gärverlauf in [290] irgend erheblicher Weise. Freilich entbehrt bei Hefen von sehr geringem und inkonstantem Invertingehalt die Saccharasebestimmung leider der Strenge, die ihr in den gewöhnlichen Fällen eigen ist. Aber auch bei Annahme der für unsere Schlußfolgerung ungünstigsten Werte zeigt es sich, daß bei der Rohrzuckergärung durch sehr invertinarme Hefen in saurem Medium die Gärung der Spaltung vorauseilt.

Versuche bei $p_H = 2$ mit sehr invertinarmer Hefe.

	1.	2.	4. Beispiel
Halbspaltungszeit	213	465	305 Min.
Halbgärzeit	190	318	226 ,,

Die Genauigkeit, mit der hier die Bestimmung des Inversionsvermögens vorgenommen werden konnte, ist wahrscheinlich ausreichend gewesen, aber die Unterschiede zwischen den Zeiten der Spaltung und der Gärung sind, anders als bei den maltasefreien Hefen, nicht groß. Bei diesem Vergleich sollte noch berücksichtigt werden, daß bei der Invertinbestimmung hemmend wirkende Spaltungsprodukte zugegen sind, während sie im Gärversuch beseitigt werden. Die Menge des gebildeten und für die Gärung verfügbaren Invertzuckers ist indessen gewiß im Verhältnis zum vorhandenen Rohrzucker sehr gering. Es ist unbekannt, ob der Zymasekomplex den in der Zelle vorhandenen Invertzucker gegenüber dem in weit größerer Menge in die Zelle einströmenden Rohrzucker vorzieht. H. v. Euler und G. Lundeqvist[1] haben zu dieser Frage eine bemerkenswerte Ansicht geäußert: „Für die Gärungsgeschwindigkeit kommt nicht sowohl die Konzentration der die Hefe umgebenden Lösung in Betracht, als vielmehr die in den Zellen vorhandene Zuckermenge bzw. die Menge der Komplexe Zucker-Plasma." Es scheint aber in den angeführten Gärversuchen, in denen die Invertinwirkung in der Zeit der Viertel- oder Halbgärung als Primärvorgang der beobachteten Gärung kaum mehr ausreicht, dennoch ein Teil des gebildeten Invertzuckers, vom Rohrzucker aus dem Gärungssystem verdrängt, die Hefezelle zu verlassen. In den Zeitpunkten der Viertel- und Halbgärung bei so stark verminderter Invertinwirkung finden sich nämlich [291] beträchtliche Mengen von reduzierend wirkender Substanz in der Gärflüssigkeit.

Es ist daher wahrscheinlich, daß die gewöhnlichen Hefen, die invertinreich auftreten, imstande sind, Rohrzucker direkt d. h. ohne vorangehende Inversion zu vergären.

Experimenteller Teil.

Invertingehalt und Gärvermögen nach Einwirkung von Säuren und Alkalien.

Verdünnte Mineralsäuren und verdünnte Alkalilaugen bewirken gemäß den nachstehenden Versuchen Verminderung des Invertingehaltes ohne Abtötung der Hefe.

[1] Diese Zs. Bd. 72, S. 97, und zwar S. 103 [1911].

Das Gärvermögen erfährt keine Einbuße oder nur geringe. Obergärige und untergärige Hefen stimmen im wesentlichen überein, aber das Verhalten wechselt einigermaßen von einer Hefeprobe zur anderen, zum Beispiel die Widerstandsfähigkeit der Gärkraft. Die Unterhefen, Reinzuchthefe und einige Male in der Löwenbrauerei geführte Hefen, zeigten Rückgang des Invertingehalts, entsprechend den Anfangszeitwerten von etwa 100 bis 350 und den Endzeitwerten von 3000 bis 5000. Die Gärkraft wurde eher als bei obergäriger Hefe geschwächt. Die angewandten obergärigen Hefen, reine Branntweinhefen der Zuckerraffinerie Frankenthal, Fabrik Regensburg, waren von vornherein ärmer an Invertin, entsprechend den Zeitwerten 500 bis 1000. Ihr Invertingehalt sank auf ungefähr $^1/_{20}$, nämlich zu Zeitwerten von 10000 bis 15000 und beträchtlich darüber hinaus. Der letzte kleine Anteil des Enzyms scheint für die Säure, die in die Hefezelle eintritt, nicht mehr erreichbar zu sein. Auch invertinreiche Hefe, nach dem Verfahren unserer neunten Arbeit gewonnen, ergab nach kurzer Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure einen hundertemal schlechteren Zeitwert, z. B. 5000. Es gelingt also, gewöhnliche Hefe ohne bedeutende Änderung des Gärvermögens 15- bis 20mal invertinreicher und andererseits 30fach invertinärmer zu machen.

Für die Behandlung mit Mineralsäure nach den Versuchen der Tab. 1 ist z. B. 0,15- bis 0,30n-Schwefelsäure sehr geeignet, 1stündige Einwirkung genügt. Zu demselben Ende

[292]

Tabelle 1.

Inversions- und Gärvermögen nach Einwirkung von Schwefelsäure bei Zimmertemperatur.

Nr.	Hefe	Angewandte Säure	Versuchsdauer (Stdn.)	Inv.-Zeitwert vor Behandlung	Inv.-Zeitwert nach Behandlung	Halbgärzeit (30°) vor Behandlung Min.	Halbgärzeit (30°) nach Behandlung Min.
1	Oberg. Hefe (Regensb.)	0,10 n.	14	480	12000	173	271
2	dgl.	0,13 n.	2	685	10400	158	166
3	dgl.	0,15 n.	2	920	18700	161	189
4	dgl.	0,15 n.	3	920	16200	161	203
5	dgl.	0,15 n.	1	1000	13100	165	184
6	dgl.	0,15 n.	4	1000	16400	165	207
7	dgl.	0,15 n.	2	450	4900	143	163
8	dgl.	0,20 n.	$^1/_4$	608	1950	173	175
9	dgl.	0,25 n.	$^1/_4$	608	2950	173	190
10	dgl.	0,25 n.	1	608	15000	173	185
11	dgl.	0,20 n.	2	920	15500	161	203
12	dgl.	0,20 n.	2	500	13000	157	153
13	dgl.	0,20 n.	2	500	13500	157	184
14	dgl.	0,20 n.	2	800	13500	180	—
15	dgl.	0,25 n.	2	650	10600	152	169
16	dgl.	0,30 n.	2	480	9450	173	182
17	dgl.	0,40 n.	2	650	10500	152	230
18	Brauereihefe Re-Reinz.	0,10 n.	5	94	4280	—	226
19	Brauereihefe Rd	0,15 n.	$^1/_4$	350	790	111	123
20	dgl.	0,15 n.	2	366	3200	—	178
21	dgl.	0,20 n.	1	350	3660	111	334

führt (vgl. Tab. 2) die Behandlung mit 0,05n-Natronlauge in 1 Stunde oder auch schon in 10 Minuten. Bei längerer Dauer der Alkalibehandlung würde der Invertin-

gehalt noch bedeutend sinken, aber zugleich die Gärkraft leiden. Die anzuwendenden Reagenzien sind konzentrierter, als wenn das Invertin in dem weniger geschützten Zustand wäßriger Lösungen der Einwirkung von Säuren oder Alkalien unterläge. Auch aufeinanderfolgende Behandlung mit Mineralsäure und mit Alkalilauge oder umgekehrt wurde mit dem gleichen Ergebnis angewandt.

Die Hefeproben wurden in die 10fachen Mengen der [293] Reagenzien eingetragen und bei Zimmertemperatur stehen gelassen; Versuche bei 0° führten nicht zu besseren Resultaten. Am Ende der Versuchszeit neutralisierten wir die Flüssigkeit und trennten die Hefe in der Zentrifuge ab. Sie wurde einmal ausgewaschen und diente sogleich zur Bestimmung des Trockengewichts, Invertingehalts und Gärvermögens. Aber auch bei 20stündigem Aufbewahren im Eisschrank blieb die Inversions- und die Gärfähigkeit unverändert. Die Alkalien wirkten auf den Inhalt der Hefezelle stärker ein als die Säuren. Die Resultate der Behandlung waren ungleichmäßiger, es bedurfte größerer Vorsicht, damit das Gärvermögen nicht litt. Die auf der Nutsche abgepreßte Hefe hatte nach der Alkalibehandlung höheres Trockengewicht (z. B. 28 %).

Tabelle 2.
Inversions- und Gärvermögen nach Einwirkung von Natronlauge bei Zimmertemperatur. (Angewandt Brennereihefe Regensburg.)

Nummer	Angew. NaOH	Versuchsdauer (Stdn.)	Invertinzeitwert vor Behandlung	Invertinzeitwert nach Behandlung	Halbgärzeit (30°) vor Behandlung Min.	Halbgärzeit (30°) nach Behandlung Min.
1	0,05 n.	1/2	608	5470	173	228
2	0,05 n.	1	920	25 500	161	302
3	0,05 n.	1	510	5 200	148	207
4	0,055 n.	1	510	8 100	148	196
5	0,07 n.	1	510	2400	166	165
6	0,10 n.	1/6	608	9250	173	219
7	0,10 n.	1/2	450	8600	166	438
8 Hefe aus Tab. 1, Nr. 10	0,10 n.	1/2	15000	11000	185	228
9 Hefe aus Vers. 1	0,25 n-H_2SO_4	1	5470	14000	228	255

Phosphorsäure (0,5 bis 1,0 molar) beeinflußt den Invertingehalt in geringerem Maße, fast gar nicht Borax (2proz. Lösung). Flußsäure (schon z. B. 0,01 n.) vernichtet das Gärvermögen gänzlich, ohne den Invertingehalt herabzumindern.

Die an Invertin verarmte Hefe (z. B. untergärige Hefe vom Zeitwert 3220) erholte sich bei der Gärführung mit [294] niedrigster Zuckerkonzentration zum Beispiel in 8 Stunden zu einem Invertingehalt, welcher denjenigen der Ausgangshefe übertraf (Zeitwert 278).

Bemerkungen zur Invertinbestimmung. Das Invertin ist in der Hefe gemäß den Untersuchungen von J. O'Sullivan[1], von H. von Euler[2], sowie von

[1] Journ. chem. Soc. Bd. 61, S. 593, 926 [1892].

[2] H. v. Euler und S. Kullberg, Diese Zs. Bd. 71, S. 14, und zwar S. 20 [1911]; Bd. 73, S. 85, und zwar S. 39 [1911]; H. v. Euler und O. Svanberg, Diese Zs. Bd. 105, S. 187, und zwar S. 194 u. 211 [1919]; Bd. 106, S. 201, und zwar S. 214 [1919].

R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[3] zuverlässig so zu bestimmen, daß man die frische Hefe unter Zusatz von etwas Zellgift (Toluol) und von Puffer auf Rohrzuckerlösung einwirken läßt. Auch bei invertinärmeren ober- und untergärigen Hefen von den Zeitwerten 700 bis 1000 ergibt die Analyse widerspruchsfreie Resultate. Die Bestimmungen fallen aber nicht mehr sicher aus bei den an Invertin außerordentlich armen Hefen, zu denen wir in der beschriebenen Weise gelangen. Die erste Beobachtungszeit der Invertinbestimmung ergibt keine oder fast keine Invertinwirkung, aber die späteren ergeben Zeitwerte von z. B. 25000 und 20000. Es scheint, daß das wenige noch vorhandene Invertin unzugänglich ist, vielleicht durch Gerinnungsvorgänge versperrt. Es ist nötig, die Hefe so wie bei der Maltasebestimmung nach R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[4] im unverdünnten Zustand mit Zellgift, am besten mit Essigester, abzutöten und gegebenenfalls die dabei auftretende Säure zu neutralisieren. Nach der Vorschrift von WILLSTÄTTER und STEIBELT genügen 4 bis 6 Minuten zur Verflüssigung. Für die Analyse der invertinärmsten Hefen scheint es aber besser zu sein, die Verflüssigung etwa 30 Minuten andauern zu lassen. In mehreren Spaltungszeiten findet man nach zu kurzer Einwirkung des Zellgiftes oft ansteigende Werte des Inversionsvermögens, nach der länger dauernden Verflüssigung aber gewöhnlich gute Übereinstimmung.

[295] Wenn bei diesen Hefen zu wählen ist zwischen den äußerst niedrigen Werten, die sich direkt bestimmen lassen, und den höheren, die nach Verflüssigung gefunden werden, so sollen die letzteren vorgezogen werden, weil sie für den zu ermittelnden Effekt der direkten Saccharosegärung die ungünstigeren sind.

Es ist nach dem vorliegenden Versuchsmaterial wenig wahrscheinlich, daß bei der Abtötung und Verflüssigung durch Zellgift in unverdünntem Zustand Enzymneubildung eintritt. Wahrscheinlich beruhen die beobachteten Differenzen darauf, daß das die Vorbehandlung mit Alkali oder Säure überdauernde Invertin für den in die unversehrte Zelle eintretenden Rohrzucker nicht mehr genügend zugänglich ist.

Andere Enzyme nach der Säure- oder Alkalieinwirkung.

Maltase. Auf Brauereihefe ließen wir 0,15n-H_2SO_4 2 Stunden lang einwirken. Während vom Invertin 12% übrig blieben, ging die Maltase bis auf etwa 2% verloren. Der Maltasezeitwert war zuvor 42, nach der Säurebehandlung betrug er ungefähr 2000 (nämlich 1880 bei der 1., 2360 bei der 2. Beobachtungszeit). Die an Maltase verarmte Hefe vergor Malzzucker mit einer etwas verlängerten Halbgärzeit von 167 Minuten. Dabei verbesserte sich der Maltasegehalt zum Zeitwert 106.

Bei Gärführung mit niedrigster Zuckerkonzentration erholte sich der Maltasegehalt der säurebehandelten Hefe in 8 Stunden zum Zeitwert 63.

Die Brennereihefe von Regensburg war von vornherein so arm an Maltase, daß sie sich für die Beobachtung der Maltaseabnahme nicht eignete.

---

[3] Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21].
[4] Diese Zs. Bd. 111, S. 157, und zwar S. 168 [1920].

Proteasen. Die proteolytische Wirksamkeit der Hefe leidet zugleich mit der carbohydratischen, aber in geringerem Maße.

Herr Dr. W. GRASSMANN hatte die Freundlichkeit, im Zusammenhang mit einer demnächst zu veröffentlichenden Untersuchung über Hefeproteasen einige Versuche an invertinarm gemachter Hefe auszuführen.

Tryptische Wirkung. Je 70 g der Ausgangshefe und der mit H_2SO_4 behandelten Hefe (Zeitw. 16200) wurden mit je 4 ccm Chloroform verflüssigt und mit 70 ccm Wasser versetzt. Unter Neutralisieren der entstehenden [296] Säure ließen wir die enzymatische Freilegung 40 Stunden dauern und das gebildete Autolysat noch einige Tage im Eisschrank stehen.

Zur Bestimmung diente Gelatine als Substrat.

2,0 ccm Autolysat mit 0,6 g Gelatine und 1,6 ccm $^{m}/_{5}$-Dinatriumcitrat (p_H = 5,0) im Vol. von 10 ccm. Spaltung in 24 Stunden bei 40°, gemessen in alkoholischer Lösung mit $^{n}/_{5}$-KOH.

	Ausgangshefe	Invertinarme Hefe
	2,00	0,23 ccm $^{n}/_{5}$-KOH
Kontr. ohne Substrat	0,25	0,04 ,, ,,
Aciditätszunahme	1,75	0,19 ,, ,,

Die ereptische Wirkung wurde ebenfalls verfolgt, indessen noch ohne ein fertig ausgearbeitetes Verfahren für die Freilegung des Hefeerepsins. Aus den gefundenen Zahlen der ereptischen Wirkung ist nur zu schließen, daß ein Rückgang neben der Invertinzerstörung stattgefunden hat.

Je 12,5 g der beiden Hefen werden mit 1 ccm Essigester im 50-ccm-Meßkolben verflüssigt, darauf mit 30 ccm Wasser verdünnt und die entstandene Säure während einer Freilegungsdauer von 90 Minuten mit NH_3 neutralisiert. Nach Auffüllen auf 50 ccm dienten 2 ccm der Suspension (entspr. 0,5 g Hefe) für die Bestimmung mit 0,226 g d,l-Leucylglycin und 3 ccm $^{m}/_{3}$-Natriumammonphosphatpuffer (p_H = 7,8) in 10 ccm Gesamtvolumen. Spaltung in 1 Stunde bei 40°, gemessen mit $^{n}/_{5}$-KOH.

	Ausgangshefe	Invertinarme Hefe
	1,66	0,90 ccm $^{n}/_{5}$-KOH
Kontr. ohne Substrat	0,18	0,23 ,, ,,
Aciditätszunahme	1,48	0,67 ,, ,,
Entspr. Spaltung (asym.). . .	49 %	22 %

Invertinbildung in invertinarmer Hefe bei der Gärung.

Nach Verlust von etwa 95% des Invertins wies die Hefe in vielen Beispielen fast unveränderte Gärkraft auf. Die Induktionszeit bis zum Eintritt lebhafter Gärung war verlängert, aber die ganze Zeit der Entwicklung der halben möglichen Kohlensäuremenge war in günstigen Versuchen nicht oder wenig vermehrt. Aus solchen Gärversuchen lassen sich aber keine überzeugenden Folgerungen hinsichtlich der Ausschaltung des Invertins von der Rohrzuckergärung ziehen, weil die Hefe während der Gärung wieder Invertin bildet. Unter den Bedingungen der Halbgärzeitbestimmung erholte sich z. B. die mit Säure behandelte Hefe vom Zeitwert 10000 bis 12000 rasch zu Zeitwerten, die zwischen 1500 und 2000 lagen (Tab. 3); dann blieb [297] im weiteren Verlauf der Gärung der Invertingehalt stehen. Nach der Alkalibehandlung vermochte die Hefe in einigen Beispielen (Nr. 3 und 4 der Tab. 3) nur sehr wenig Invertin zurückzubilden, aber dieses Verhalten scheint schwer reproduzierbar zu sein. In einigen Fällen war nach der Alkalibehandlung die Gärkraft erheblich vermindert, in anderen war sie sehr gut geblieben, indessen es bildete sich wiederum Invertin zurück.

Tabelle 3.
Invertinzuwachs in invertinarmer Hefe bei Gärung unter den Bedingungen der Halbgärzeitbestimmung.

Nr.	Vorbehandlung der Hefe	Zeitwert vor	Zeitwert nach Behandlung	¹/₄-Gärung Gärzeit	¹/₄-Gärung Zeitwert danach	Halbgärung Gärzeit	Halbgärung Zeitwert danach
1	0,13 n-H_2SO_4, 2 Std.	685	10500	95	1750	166	—
2	0,2 n-H_2SO_4, 2 „	685	12100	98	1480	171	1910
3	0,05 n-NaOH, ¹/₂ „	605	5470	–	—	228	4120
4	0,05 n-NaOH, 1 „	800	11400	214	7270	—	—

Auch bei Gärung in saurem Medium, bei $p_H = 2{,}05$ bis 2,2, erfolgt Invertinvermehrung (Tab. 4) und zwar mit derselben Geschwindigkeit und in demselben Maße wie bei der Gärung unter normalen Bedingungen. Die Erscheinung erreichte in einem Versuche während ¹/₈-Gärung (85 Min.), in einem anderen schon in 50 Min. ihr Ende.

Tabelle 4.
Invertinzuwachs in invertinarmer Hefe bei Gärung in saurem Medium.

Nr.	Vorbehandlung der Hefe	Zeitwert vor	Zeitwert nach Behandlung	p_H d. Gärflüss.	¹/₄-Gärung Gärzeit	¹/₄-Gärung Zeitwert danach	¹/₂-Gärung Gärzeit	¹/₂-Gärung Zeitwert danach
1	0,2 n-H_2SO_4, 2 Std. . .	500	13000	2,15	127	940	208	1180
2	0,2 n-H_2SO_4, 2 „ . .	800	13500	2,10	116	1180	210	1320
					(nach 50 Min. 1150)			
3	0,15 n-H_2SO_4, 2 „ . .	450	4900	2,05	114	1550	204	1660
4	0,1 n-NaOH, ¹/₂ „ . .	450	8600	2,05	280	7900	438	—
5	0,05 n-NaOH, 1 „ . .	510	8100	2,05	130	1650	226	1980
					(nach ¹/₈-Gärung in 85 Min. 1670)			

[298] Die Enzymmengen, die bei diesem Ansteigen der Invertingehalte, also beim Rückgang der Hefezeitwerte, gebildet werden, sind nicht groß. Beispielsweise enthalten 100 g trockene Hefe vom Zeitwert 12000 0,167 S.E. und bilden bei der Erholung zum Zeitwert 1500 1,17 S.E., während 100 g trockene Hefe vom Zeitwert 300, die in der neunten Arbeit zum Zeitwert 20 geführt wurden, 93,3 S.E. bildeten.

Invertinwirkung in saurem Medium.

Es ist die Methode dieser Arbeit, die invertinarm gemachte Hefe unter solchen Bedingungen Rohrzucker vergären zu lassen, daß die Gärgeschwindigkeit nicht erheblich hinter der normalen zurückbleibt und daß die Saccharasewirkung möglichst herabgesetzt wird. Dies wird in saurer Gärflüssigkeit erreicht und zwar bei p_H = ungefähr 2, am besten 2,05. Die Gärung ist unter diesen Umständen, wie sich nach einigen Beispielen der Tab. 5 schätzen läßt, um etwa 20 bis 30% verlangsamt. Dagegen ist bei $p_H = 1{,}80$ bis 1,95 die Gärgeschwindigkeit bedeutend geringer.

Tabelle 5.
Vergleich der Halbgärzeiten von obergäriger Hefe unter üblichen Bedingungen und bei p_H = ungefähr 2.

Nr.	Vorbehandlung der Hefe	Zeitwert	p_H bei der Gärung	Halbgärzeit unter normalen Bedingungen	Halbgärzeit in saurem Medium
1	0,05 n-NaOH, 1 Std.	5200	1,95	207	294
2	ebenso	8100	2,05	196	226
3	0,1 n-NaOH, 1/2 Std.	8600	2,05	1/4-Gär. 244	1/4-Gär. 288
4	0,2 n-H_2SO_4, 2 „	13000	2,1	153	190
5	ebenso	13000	2,15	153	208
6	0,15 n-H_2SO_4, 2 Std.	4900	2,05	163	203

In diesem sauren Medium beträgt die Wirkung des Invertins, wenn sie mit einem gereinigten Saccharasepräparat bestimmt wird, nur ungefähr 7% von derjenigen bei optimaler Acidität (p_H = 4,63). Die Bestimmungen (Tab. 6) führten wir mit Rücksicht auf den Vergleich mit der Gärung bei 30° aus, [299] nämlich unter den Verhältnissen der Vergleichszeitwertbestimmung nach R. Willstätter und W. Steibelt[1]. Infolge der Empfindlichkeit des Enzyms gegen Säure geht die Wirksamkeit, also auch der Aktivitätsquotient, von der ersten Ablesung (Beobachtungszeit etwa 30 Min.) zu den folgenden zurück.

Tabelle 6. Wirkung von Invertin (S.W. 3,7) bei p_H = ungefähr 2.

p_H	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Spaltung (%)	Verhältnis der Wirkung zur optimalen (%)
1,85	0	5,27	0	—
	30	4,58	10,2	4,5
	71	4,14	16,5	3,3
	210	3,80	21,4	1,5
2,03	0	5,27	0	—
	46	3,80	21,5	6,8
	87	3,24	29,6	5,3
	226	1,80	50,6	3,9
2,07	0	5,27	0	—
	29	4,40	12,7	6,0
	70	3,81	21,3	4,5
	105	3,17	30,2	4,5
2,1	0	5,27	0	—
	30	4,19	15,8	7,5
	57	3,53	25,4	6,8
	113	2,58	39,2	5,8
2,13	0	5,27	0	—
	23	4,21	15,4	9,6
	58	3,28	29,1	7,9
	114	2,38	42,2	6,3

Bei der Bestimmung mit Hefe selbst und zwar mit der durch Essigester verflüssigten invertinarmen Hefe (Zeitwert 2000 bis 1000) ergibt sich nach den Beispielen der

[1] Diese Zs. Bd. 111, S. 157, und zwar S. 169 [1920].

Tab. 7 der Aktivitätsquotient bei $p_H = 2$ kaum höher als mit gereinigtem [300] Enzym. Das noch in der Hefezelle enthaltene Invertin genießt also wenig Schutz durch vorhandene Puffer. Man erkennt, daß sich hier in der abgetöteten Zelle fast dieselbe Acidität einstellt wie in der wäßrigen Lösung. Dies scheint aber nur für die

Tabelle 7.
Invertinwirkung invertinarmer Hefe bei p_H = etwa 2,1 (nach Verflüssigung bei 30°).

Nr.	Vorbehandl. der Hefe	Zeitwert	p_H	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Spaltung (%)	Aktivitäts-quotient
1	Alkali	2300	2,0	0	5,27	0	—
				47	4,67	8,8	7,4
				166	4,39	12,8	3,3
2	Alkali	1650	2,0	0	5,27	0	—
				148	3,15	31	6,2
				334	3,02	33	—
3	Alkali	2300	1,95	0	5,27	0	—
				49	4,65	9,1	6,0
				166	4,49	11,4	2,4
4	Alkali	1900	2,1	0	5,27	0	—
				96	4,80	6,8	5,1
				162	4,38	12,8	6,2
5	Säure	1050	2,1	0	5,27	0	—
				84	3,75	22	5,8
				156	3,30	29	3,9
				317	3,08	32	2,9
6	Säure	940	2,15	0	5,27	0	—
				80	2,42	42	11,8
				171	1,56	54	7,6
7	Säure	1180	2,15	0	5,27	0	—
				52	4,10	17,1	10,7
				83	3,94	19,4	7,7
8	Säure	940	2,2	0	5,27	0	—
				86	1,73	51,7	14,6
				172	0,64	67,7	10,1

mit Säure oder Alkali vorbehandelte und an [301] Invertin verarmte Hefe zu gelten, auch wenn sie bei der Gärung wieder etwas mehr invertinhaltig geworden ist.

Bei den ganz invertinarmen Hefen unmittelbar nach Alkali- oder Säurebehandlung (ohne Invertinneubildung im Gärungsverlauf) ist die nach Verflüssigung bestimmte Wirksamkeit des Invertins noch geringer.

Tabelle 8. Wirkung sehr invertinarmer Hefe bei $p_H = 2,1$ (bei 30°).

Nr.	p_H	Zeitwert	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Spaltung (%)	Verh. der Wirkung zu derj. bei opt. p_H
1	2,15	8100	118	4,93	5,0	4,8
			1590	3,93	19,6	1,6
2	2,10	13500	1178	4,28	14,4	1,35
3	2,05	13500	381	5,10	2,5	—
			1344	4,20	15,7	2,57

Für die Beurteilung der Invertinwirkung während der Gärung ist die Frage von Bedeutung, ob vielleicht die lebende Hefe in saurem Medium stärker auf Rohrzucker zu wirken vermag als die abgetötete. Diese Frage läßt sich an der durch Gärführung bei niedriger Zuckerkonzentration sehr invertinreich gemachten Hefe entscheiden. Hier ist die Invertinwirkung im Verhältnis zur Gärgeschwindigkeit so stark und zwar auch noch in dem zu saueren Medium, daß die Gärung in der Beobachtungszeit ganz ohne Einfluß ist. Die Bestimmung in der lebenden Hefe (also ohne Zellgift) ergibt einen nur wenig höheren Aktivitätsquotienten als die übliche Bestimmung nach Abtötung. Diese Versuche (Tab. 9) zeigen auch, daß das Invertin in den zu hohem Invertingehalt geführten Hefen, anders als in den mit Säure oder Alkali behandelten, durch natürliche Pufferung einigermaßen gegen die Säure geschützt ist. Der Quotient der Wirkung in stark saurem und in optimalem Medium ist höher als bei Invertinlösungen und als bei den verflüssigten invertinarm gemachten Hefen.

[302]

Tabelle 9.
Vergleich der Rohrzuckerspaltung bei p_H etwa 2 in lebender und in abgetöteter invertinreicher Hefe.

Nr.	Zeitwert der Hefe	p_H	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Spaltung (%)	Aktivitätsquotient
			Lebende Hefe			
1	23	1,88	0	5,27	0	—
			17	3,74	22,3	15,5
			37	2,65	38,3	13,8
			65	1,55	54,3	11,9
2	23	1,90	16	3,56	25,0	18,8
			37	2,42	41,7	15,2
			65	1,19	59,5	13,4
3	26	1,95	29	3,39	27,4	15,5
			65	1,98	48,1	13,6
			99	1,06	61,2	11,9
4	26	2,0	29	3,06	32,2	18,5
			55	1,93	48,8	16,3
			105	0,42	70,7	14,3
5	26	2,03	38	2,95	33,8	15,0
			112	0,60	66,8	12,6
			149	0,05	76,2	11,7
			Verflüssigte Hefe			
6	23	1,95	19	3,04	32,6	14,1
			37	1,92	48,9	11,7
			66	0,86	64,3	10,5
7	26	2,05	41	1,37	56,8	16,5
			117	−0,62	85,8	8,8

Rohrzuckergärung durch invertinärmste Hefen bei $p_H = 2$.

Mit den durch Säure- oder Alkalibehandlung sehr invertinarm gemachten Hefen wurde der Rohrzucker in der sauren Lösung vergoren. Um die Geschwindigkeiten der Gärung und der möglichen Zuckerinversion zu vergleichen, ermittelten wir an

mehreren Zeitpunkten (1/4- und 1/2-Gärung) den jeweiligen Invertingehalt der Hefe und ihre Aktivität bei dem p_H des Gärversuches. Die Bedingungen der Gärung gemäß dem [303] Vorschlag von WILLSTÄTTER und STEIBELT für die Bestimmung der Halbgärzeit (30°, 20 ccm 4,75proz. Rohrzuckerlösung mit der 0,2 g trockener Hefe entsprechenden Menge frischer Hefe) und die Bedingungen der Invertinbestimmung (Vergleichszeitwert bei 30° mit 4,75 g Rohrzucker unter Zusatz von 2 ccm 20proz. NaH_2PO_4 in 100 ccm) waren so ähnlich wie möglich. Die Messung der Kohlensäure geschah wie in der Untersuchung von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] mit besonderen Vorsichtsmaßregeln in Büretten über Kohlensäure gesättigtem Wasser von konstanter Temperatur. Parallel mit dem Gärversuche führten wir im Schüttelthermostaten von 30° eine Gärung in 20fach größerem Maßstabe aus, um in aufeinanderfolgenden Proben den Invertingehalt und die Invertinaktivität bei $p_H = 2$ zu ermitteln.

Das saure Medium der Gärflüssigkeit, 0,01 n-H_2SO_4 entsprechend, erforderte infolge der Gegenwart der Nährstoffe (0,25 g KH_2PO_4, 0,2 g Acetamid und ein wenig $CaSO_4$ und $MgSO_4$) etwa 1 ccm n-H_2SO_4 auf 20 ccm. Demgemäß wurde zur Bestimmungslösung die doppelte Menge primären Phosphats zugesetzt, nämlich 1 g KH_2PO_4. Die Hefe beeinflußt die Acidität der Lösung, indem sie gewisse Mengen und zwar etwas wechselnde von Säure adsorbiert. Im Vorversuch wurde mit der Indicatorenmethode der für die Gärflüssigkeit + Hefe erforderliche Zusatz von n-H_2SO_4 ausprobiert, im Gärversuche selbst wurde die Wasserstoffzahl am Ende kontrolliert.

Die folgenden Beispiele zeigen, daß die Zeiten der 1/4- und 1/2-Gärung den Zeiten entsprechender Spaltung nahe kamen und daß die Gärung im allgemeinen sogar etwas rascher verlief als die mögliche Rohrzuckerspaltung. Dabei wurde aber der für die Gärung so knapp verfügbare Invertzucker nicht etwa vollständig vergoren, sondern die Gärflüssigkeit enthielt nach 1/4- und 1/2-Gärung erhebliche Mengen von reduzierend wirkender Substanz.

Erstes Beispiel.

Angewandt Brennereihefe von Regensburg, Invertinzeitwert 500, Halbgärzeit 157 Minuten.

[304] Nach 2stündigem Behandeln mit 0,2 n-H_2SO_4 war der Zeitwert 13000 und die Halbgärzeit 153.

Gärung bei $p_H = 2,1$.
1/4-Gärzeit 125, 1/2-Gärzeit 190 Min.
Zeitwert nach 1/4-Gärung 1050, nach 1/2-Gärung 1375.

Nach 1/4-Gärung: Nulldrehungszeit unter den Bedingungen der Bestimmung nach C. O'SULLIVAN und TOMPSON, indessen bei $p_H = 2,1$, 17700 Min. (Nr. 5 der Tab. 7). Daher Anfangswert der Hefe für Rohrzuckerspaltung bei $p_H = 2,1$ etwa 1,3% der normalen Aktivität, entsprechend 1/4-Spaltung in 5200 Min.

Daher 1/4-Spaltungszeit 94, 1/2-Spaltungszeit 213.

[1] Diese Zs. Bd. 120, S. 42 [1922].

Zweites Beispiel.

Brennereihefe von Regensburg, Zeitwert 510, Halbgärzeit 148.

Nach 1 stündiger Behandlung mit 0,05 n-NaOH war der Zeitwert 5200 und die Halbgärzeit 207.

Gärversuche bei p_H	1,78	1,80	1,85	
$^1/_4$-Gärzeit	325	251	192	Min.
$^1/_2$-Gärzeit	613	482	350	„

Gärversuch bei p_H = 1,95.

Min.	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330
ccm CO_2	7	15	33	49	64	79	94	108	122	136	150

Also $^1/_4$-Gärzeit 166, $^1/_2$-Gärzeit 318 Min.

Im Gärversuch bei p_H = 1,8 (ohne großen Einfluß des p_H) wurde nach $^1/_4$-Gärung der Zeitwert der Hefe = 2300 und die Nulldrehungszeit bei p_H = 2,0 31200, bei p_H = 1,95 38600 Min. gefunden (Nr. 3 der Tab. 7).

Mithin $^1/_4$-Spaltungszeit bei p_H = 2,0 166, bei p_H = 1,95 200 Min.
„ $^1/_2$- „ „ p_H = 2,0 375, „ p_H = 1,95 465 „

In der Gärflüssigkeit wurde das Reduktionsvermögen nach Sonntag und Bertrand bestimmt. Unter den normalen Gärbedingungen enthielten je 20 ccm nach $^1/_2$-Gärung reduzierende Substanz entsprechend 98 mg, bei p_H = 1,95 22 mg, nach $^1/_4$-Gärung bei p_H = 1,85 22 mg und bei p_H = 1,8 16 mg Invertzucker, während er bei p_H = 1,75 fehlte.

[305] Drittes Beispiel.

Brennereihefe vom Zeitwert 450, Halbgärzeit 166.

Nach $^1/_2$stündiger Behandlung mit 0,1 n-NaOH betrug der Zeitwert 8600 und die Halbgärzeit 438.

Gärung bei p_H = 2,05.
$^1/_4$-Gärzeit 280 Min.

Zeitwert nach $^1/_4$-Gärung 7350. Daraus berechnet sich unter Annahme eines Aktivitätsquotienten von 7% für p_H = 2 die Nulldrehungszeit von 105000 Min.

Daher $^1/_4$-Spaltungszeit 533 Min.

Viertes Beispiel.

Brennereihefe von Regensburg, Zeitwert 510, Halbgärzeit 148.

Nach 1 stündiger Behandlung mit 0,055 n-NaOH war der Zeitwert 8100, die Halbgärzeit 196 Min.

Gärung bei p_H = 2,05.

Min.	30	60	90	120	150	180	210	240
ccm CO_2	6	15	37	59	83	110	133	156

Also $^1/_4$-Gärzeit 130, $^1/_2$-Gärzeit 226 Min.

Zeitwert der Hefe nach $^1/_8$-Gärung 1670, nach $^1/_4$-Gärung 1650, nach $^1/_2$-Gärung 1980.

Anfangswert der Hefe für Rohrzuckerspaltung bei $p_H = 2,15$ höchstens 5% der normalen Aktivität, entsprechend $^1/_4$-Spaltung in 860 Min. Nach $^1/_4$-Gärung Nulldrehungszeit der Bestimmung nach O'SULLIVAN und TOMPSON, aber für $p_H = 2,0$, 26800; nach $^1/_2$-Gärung Nulldrehungszeit für $p_H = 2,1$ 30500 Min. Aus der ersten Zahl berechnet sich

$^1/_4$-Spaltungszeit **132**, $^1/_2$-Spaltungszeit **305** Min.

Aus der zweiten Zahl berechnet sich $^1/_2$-Spaltungszeit 367 Min.

Auch bei diesem Gärversuch schien reichlich Invertzucker aufzutreten. In 20 ccm Gärflüssigkeit (anfangs 0,95 g Rohrzucker enthaltend) fanden sich reduzierende Substanzen entsprechend 67,5 mg Invertzucker nach $^1/_4$-Gärung, 44 mg nach $^1/_2$-Gärung.

Bei der Bestimmung der reduzierenden Lösungen hat uns Herr HELGO LAMPE freundlichst unterstützt und uns zu Dank verpflichtet.

Zeitschrift für physiologische Chemie 151, S. 1 [1926].

57. ZUR KENNTNIS DES INVERTINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER, KARL SCHNEIDER und ERWIN WENZEL.

Zwölfte Abhandlung.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. September 1925.)

Theoretischer Teil.

Die vorliegende Arbeit, mit der wir unsere Beiträge zur Kenntnis des Invertins abzuschließen genötigt sind, versucht die Adsorptionsmethode weiter zu entwickeln, um Saccharase in höherem Reinheitsgrade als bisher zugänglich zu machen. Der Vergleich der qualitativen Analyse und der Stabilität reinerer Invertinpräparate soll darüber Aufschluß geben, ob einzelne chemisch definierbare Begleitstoffe für das aktive Enzym unentbehrlich, für seine Zusammensetzung wesentlich sind. Auch soll dadurch das Ausgangsmaterial verbessert und vervollständigt werden für vergleichende Versuche über Hemmung der Saccharase, wie sie R. KUHN und H. MÜNCH[1] im Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie erfolgreich in Angriff genommen haben, um die Abhängigkeit der Affinitätsverhältnisse von der Zusammensetzung der Enzymkomplexe kennen zu lehren.

In der zehnten Abhandlung wurde angestrebt, durch Anwendung von Hefen, deren Invertingehalt bei Gärführung mit geringster Zuckerkonzentration sehr hoch, z. B. auf das 15fache [2] gesteigert worden war, und mit Hilfe feinerer Verfahren der Invertinfreilegung das Ausgangsmaterial für die Darstellung von Invertin zu verbessern. Diese Versuche werden im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit weitergeführt. Die vor kurzem beschriebene fraktionierte Autolyse hat Hefeauszüge geliefert, „deren Saccharasekonzentration 4- bis 8mal größer ist als die der angewandten Hefen, während bisher der Übergang vom Pilz in das Autolysat die enzymatische Konzentration nur auf das Doppelte bis höchstens Dreifache gesteigert hatte". Durch Vervollkommnung des Freilegungsverfahrens, das sich noch mehr auswählend gestaltet, gelangen wir neuerdings zu Hefeauszügen, deren Saccharasewert 0,5 bis 1 beträgt, also sogar das 10- bis 20fache von demjenigen der invertinreichsten Hefen. Er steigt

[1] „Über Gluco- und Fructosaccharase", im Druck in dieser Zs.

allein bei der Dialyse auf 2,5 (Zeitwert 0,40). Zumal nun die große Invertinkonzentration im Autolysat, die Abkürzung des Alterns und die Verbesserung der Adsorptionsverfahren auch die früher unvermeidliche teilweise Inaktivierung des Enzyms zu verhüten gestattet, stand es wohl zu erwarten, daß die Adsorptionsmethode aus so günstigem Ausgangsmaterial Invertinpräparate von viel höherer enzymatischer Konzentration herausholen würde. Nichts Derartiges wird erreicht. Die Darstellung von Invertin wird nur bequemer. Ohne Mühe kommt man in kurzer Arbeit von der Hefe zu Invertinpräparaten von dem üblichen Grenzwerte des Saccharasewertes, d. i. etwa 5. Daran ändert sich auch nichts, wenn man die fraktionierte Autolyse der Hefe bei Zimmertemperatur in schonendster Weise ausführt und den Alterungsprozeß, durch den die Adsorption erleichtert wird, vermeidet. Die vorsichtige Freilegung des Invertins aus der Hefezelle und der in der Wärme scheinbar energischer durchgeführte Abbau der Hefemasse führen zu Invertinpräparaten von gleichem Reinheitsgrade und von übereinstimmender Zusammensetzung. Größere Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung des Invertins gibt es nur zwischen der raschen Autolyse unverdünnter Hefe (sei es bei Zimmertemperatur oder in der Wärme), die wir heute anwenden, und der früher angewandten langsameren Autolyse verdünnter Hefe. Bei dieser wird die Hefe viel weitgehender ausgeleert. Dies [3] bedeutet, daß so die Abbauenzyme viel stärker arbeiten als nach der Abtötung unverdünnter Hefe, die wir in der letzten Zeit vorzogen. Die energischere Abtötung der unverdünnten Hefe unter geeigneten Bedingungen (auch in der Wärme) führt schonendere Invertinfreilegung herbei, die gelindere, langsame Abtötung verdünnter Hefe bewirkt weniger auswählende Hefeentleerung und stärkeren Abbau des Invertinkomplexes.

Das Ergebnis ist bemerkenswert und überraschend, um so mehr, als mit der starken Anreicherung des Invertins in der Hefe nur eine geringfügige Vermehrung anderer Enzyme Hand in Hand geht. Das Mengenverhältnis der Saccharase zu den näher verwandten Stoffen (anderen Enzymen und Inaktivierungsprodukten) in den neuen Autolysaten ist weit günstiger als in den älteren. Es läßt sich noch günstiger gestalten durch Trennung des Invertins von anderen Hefeenzymen. In einer demnächst zu veröffentlichenden Untersuchung von R. Willstätter und E. Bamann wird die Maltase, deren Inaktivierungsprodukt sich bisher der Saccharase beimischte, durch auswählende Adsorption mit bestimmtem Aluminiumhydroxyd von der Saccharase abgetrennt, die enzymatische Reinheit des Ausgangsmaterials also noch mehr verbessert.

Der Vergleich der Invertinpräparate, die aus Autolysaten vom Zeitwert 1 nach den bisherigen Adsorptionsmethoden gewonnen werden können und an denen diese ihre Grenze erreichen, mit den ebenso reinen und etwas reineren Invertinpräparaten, die durch Kaolin- und Tonerdeadsorption aus Autolysaten vom Zeitwert etwa 200 gewonnen werden konnten, lehrt uns also, daß in den Autolysaten und Präparaten von heute die natürlichen Aggregate der Saccharase mit ihren Begleitstoffen mehr geschont sind und daß die natürlichen Enzymkomplexe bei der langsameren Ver-

giftung der mit Wasser verdünnten Hefe und bei den langdauernden proteolytischen Vorgängen der Alterung in tiefgreifender Weise verändert werden, wobei „die Saccharase ihre Gesellschaft mit Begleitstoffen wechselt". In Übereinstimmung damit steht es, daß die neuen Präparate bei gleichem Saccharasewerte im allgemeinen viel beständiger sind, als die früheren. [4] Beispielsweise sind zwei der reinsten Präparate, die im experimentellen Teil beschrieben werden, bei allen Vornahmen, einschließlich des letzten Eindampfens und der Elektrodialyse, in ihrer Aktivität konstant geblieben.

Wenn es also einerseits gelingt, in einer langen Folge von Operationen jede Wirksamkeitsabnahme zu vermeiden, so sind wir andererseits in allen Versuchen dieser Arbeitenreihe bei der Saccharase niemals der Erscheinung der Aktivitätszunahme begegnet, die vor kurzem H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] auf Grund der Versuche von H. v. EULER und I. LINDSTÅL mitgeteilt haben.

Die Verarbeitung der Hefeauszüge von S.W. 0,5 bis 1 durch Adsorption mit Kaolin und mit Tonerde hat in der Steigerung der enzymatischen Konzentration wieder zu der Grenze geführt, die wir in der achten Abhandlung nicht zu überschreiten vermochten. Das Enzym vom Saccharasewert etwa 5 ist mit seinen Koadsorbentien zu so festen Aggregaten vereinigt, daß es bei der Adsorption an Tonerde das Verhalten eines einheitlichen Stoffes aufweist. Einen gewissen Fortschritt erreicht man durch fraktionierte Ausfällung mit Tannin. Reinere Invertinpräparate geben unter gewöhnlichen Bedingungen mit Tannin keinen Niederschlag, aber in den bisher erreichbaren Reinheitsgraden werden sie bei 0° von Tannin gefällt. Ohne daß dieses Verfahren eine Scheidung des Enzyms von seinen hartnäckigsten Begleitern ermöglichte, hat es wenigstens erlaubt, Invertin von höherem Reinheitsgrad aus dem Tannatniederschlag zu isolieren und weniger reines in der Mutterlauge zurückzulassen. Eines der Präparate von bisher höchsten Saccharasewerten (nämlich 9,43; wegen seiner geringen Beständigkeit ist diese Zahl aus der Wirksamkeit vor der Dialyse und dem Trockengewicht nach der Dialyse abgeleitet) ist so gewonnen.

Einen bedeutenden methodischen Fortschritt erblicken wir in einem Verfahren der fraktionierten Adsorption an ein Adsorbens, das erst in der Enzymlösung erzeugt wird. Durch anteilweise Bildung eines adsorptiv wirksamen Niederschlags [5] von Bleiphosphat lassen sich die durch Kaolin und Tonerde gereinigten und nicht weiter zu reinigenden Invertinpräparate auf höhere enzymatische Konzentration bringen. Sie lassen sich derart fraktionieren, daß in den letzten Fraktionen Saccharasewerte von etwa 10 erreicht werden. Auch gelingt es mit dieser Methode, zum ersten Mal in sicherer Weise das Enzym von dem Produkt seiner Inaktivierung zu trennen. Bisher hatte die Adsorptionsmethode nicht für die Trennung des Enzyms von den ihm am nächsten verwandten Stoffen hingereicht; immer blieben „die in den kolloiden Eigenschaften dem Enzym nächstverwandten, durch das Fehlen der aktiven spezifischen Gruppe von ihm sich unterscheidenden Umwandlungsprodukte die hartnäckigsten Begleiter". Wenn Invertin durch Stehen oder Erwärmen der Lösung oder bei der

[1] Diese Zs. Bd. 145, S. 130, und zwar S. 135 [1925].

Elektrodialyse eine starke Wirksamkeitseinbuße erlitten hat, so liefert die Fraktionierung mittels des anteilweise entstehenden Bleiphosphats eine Restlösung von Invertin mit dem vor dem Aktivitätsverlust gegebenen Saccharasewerte.

Die ansehnlichen Verschiebungen im Tryptophangehalte des Invertins, die bei der fraktionierten Adsorption an Bleiphosphat beobachtet werden, bestätigen die Folgerungen, die unsere letzte Arbeit hinsichtlich der Bedeutung des Tryptophans für die Zusammensetzung der Saccharase gezogen hat. Die Entdeckung des Tryptophans im Invertin von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] war von großem Wert für die Kennzeichnung und für den Vergleich der Invertinpräparate und für die Prüfung der Leistungsfähigkeit der Adsorptionsmethoden. Es ist auch jetzt noch nicht möglich, auf einfache, leicht reproduzierbare Art die Saccharase vom tryptophanhaltigen Peptid zu befreien. Indessen sind wir, wie früher, auch in dieser Arbeit und zwar bei der Bleiphosphatadsorption einer Fraktion des Invertins vom S.W. 0,81 (indirekt bestimmt 4,17) begegnet, die das Enzym vollkommen frei von Tryptophan- (wie von Tyrosin-) Peptid enthielt. Es gelingt uns auch, schon die Freilegung des Invertins aus der Hefezelle so zu leiten, daß in dem dialysierten Autolysat von Anfang an nur geringe [6] Mengen Tryptophan beispielsweise nur 0,25 mg auf 1 S.E. treffen, während in den Endpräparaten von H. v. EULER und K. JOSEPHSON vom S.W. 3,7 und 4,00 auf 1 S.E. 0,667 und 0,695 mg Tryptophan-trafen und während die in dieser Arbeit beschriebenen reinsten Präparate von den Saccharasewerten 8,4, 11,9, 9,7 auf 1 S.E. 0,12, 0,16 und 0,18 mg Tryptophan enthielten. Wenn also auch die Forderung[1]) nicht erfüllt ist, daß „reproduzierbare Methoden angegeben werden können, nach welchen Invertinpräparate überhaupt unter Beibehaltung ihrer Aktivität von Tryptophan befreit werden können“, so dürfte doch der Nachweis überzeugend geworden sein, daß der Gehalt an Eiweißspaltungsprodukten, nämlich an irgend einem bestimmten Peptid, für die Zusammensetzung der Saccharase unwesentlich ist. Es wird im folgenden gezeigt, daß der Gehalt an Tryptophan nicht einmal für die Beständigkeit der Saccharaselösungen von Wichtigkeit ist. Wie aus den letzten Ausführungen von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[2]) hervorgeht, dürften in bezug auf die analytische Beschreibung und die Erklärung der Saccharase keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Auffassung unserer Stockholmer Kollegen und der unserigen geblieben sein.

Die Annahme[3]), „daß das Molekül eines Enzyms aus einem kolloiden Träger und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe besteht“, heischt eine Ergänzung, die nach dem nun vorliegenden analytischen Material gegeben werden kann. Die chemisch definierten Begleitstoffe der Saccharase von kolloider Natur, wie Hefegummi, tyrosinhaltiges und tryptophanhaltiges Peptid, anscheinend auch Nucleinsäuren, die wir von anderen aus dem Ausgangsmaterial stammenden Fremdstoffen

[1] Chem. Ber. Bd. 57, S. 859 [1924].

[1]) H. v. EULER und K. JOSEPHSON, Diese Zs. Bd. 145, S. 130, und zwar S. 142 [1925].

[2]) Diese Zs. Bd. 145, S. 130 [1925].

[3]) R. WILLSTÄTTER, Chem. Ber. Bd. 55, S. 3601, und zwar S. 3606 [1922].

nicht zu unterscheiden vermögen[4], treten mit der [7] Saccharase vergesellschaftet auf und wirken bei den Adsorptionsvornahmen als Koadsorbentien. Wenn es gelingt, wie es bei jedem dieser Substanztypen der Fall ist, einen solchen Begleitstoff von der Saccharase unter Erhaltung ihrer Aktivität abzutrennen, so ist der Begleiter als bedeutungslos für die Zusammensetzung des Enzyms erkannt, mag er auch vielleicht auf die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat, auf seine Hemmung durch dessen Spaltungsprodukte von Einfluß sein. Auf diesem Gedanken beruht die Methode unserer Arbeiten, unter Wechsel und Anpassung der Reinigungsvornahmen das Enzym von jedem einzelnen der chemisch definierten Begleitstoffe vollständig zu befreien. Die dabei gewonnenen Erfahrungen machen es wahrscheinlich, daß die Natur des kolloiden Trägers veränderlich ist. Ein einzelner kolloider Träger ist entbehrlich, wenn dem Enzym ein anderer geeigneter zur Verfügung steht; das Enzym vermag seine Aggregate zu wechseln. Es erscheint nur noch nicht als erreichbar, die chemisch wirkende aktive Gruppe, die man das eigentliche Saccharasemolekül nennen sollte, unter Erhaltung der Wirksamkeit von den schützenden Kolloiden vollkommen abzutrennen.

Experimenteller Teil.

I. Fraktionierte Autolyse unter Neutralisation.

Das beste Verfahren der Freilegung des Invertins ist die fraktionierte Autolyse nach der X. Abhandlung. Sie besteht in der Abtötung der unverdünnten Hefe durch Toluol, Abtrennung des Verflüssigungssaftes und kurz dauernde Autolyse bei 30°. Die Anwendung dieses Verfahrens auf die invertinreichen Hefen, gewonnen durch Gärführung bei niedrigster Zuckerkonzentration (IX. Abhandlung), lieferte statt der Autolysate vom Zeitwert 206 bis 114 Hefeauszüge vom Zeitwert 5 bis 2,5. Zu einer weiteren Verbesserung der Autolysate hinsichtlich der enzymatischen Konzentration führt die Neutralisation des Verflüssigungssaftes. Bei der Einwirkung des Zellgiftes in der ersten Phase der Autolyse tritt reichlich Säure auf. Es ist vorteilhaft, einige Zeit nach der vollständigen Verflüssigung, [8] z. B. nach 1 Stunde, Wasser (gleich dem Gewicht der Hefe) zuzusetzen und die Hefesuspension mit verdünntem Ammoniak zu neutralisieren und bis zur Abtrennung nach zwei weiteren Stunden neutral zu halten. Dann nimmt die abzutrennende Flüssigkeit mit den ersten Anteilen des Invertins eine größere Menge von Beimischungen fort als im Falle der sauren Reaktion. Auch wird dadurch die enzymatische Freilegung des Invertins gefördert. Ähnliche günstige Resultate werden erzielt, wenn man die Hefe anstatt mit Toluol durch Verreiben mit 5 bis 10% feingepulvertem Diammonphosphat verflüssigt oder besser mit Phosphat + Toluol. Der Puffer genügt, so daß Neutralisation mit Ammoniak nicht mehr nötig ist. Dieses Verfahren wurde entweder bei Zimmertemperatur (6 bis

[4] Hiervon abweichend nehmen H. v. EULER und K. JOSEPHSON an, daß der kolloide Träger genau zu unterscheiden sei von den aus dem Ausgangsmaterial stammenden Begleitstoffen (a. a. O., S. 132).

8 Stunden bis zur Abtrennung) oder bei 30° (im ganzen 3 Stunden bis zur Abtrennung) ausgeführt oder auch nur die Verflüssigung bei 30° und die nachfolgende Invertinfreilegung bei Zimmertemperatur. Man fand keine großen Unterschiede im Verlauf der Autolyse, in ihrer Dauer, in der Reinheit der entstehenden Invertinlösungen zwischen der Ausführung bei Zimmertemperatur oder bei 30°, mit oder ohne Phosphat.

Diese Verbesserung der fraktionierten Autolyse drückt sich in den überraschend günstigen Zeitwerten von 4 bis 1 aus, die beim Verarbeiten der invertinreichsten Hefen erzielt werden. Die Schwankungen in den Versuchsreihen sind indessen ziemlich beträchtlich, da sich die Hefeproben auch bei gleichartiger Vorbehandlung in den enzymatischen Vorgängen der Freilegung ungleich verhalten. Einige gute Beispiele verzeichnet die Tab. 1.

Die verschiedenen Ausführungsweisen der beschriebenen Invertingewinnung verglichen wir nicht allein, um die höchsten Reinheitsgrade der Hefeauszüge zu erzielen, sondern vielmehr um zu prüfen, ob die schonende Freilegung bei gewöhnlicher Temperatur andere Aggregate des Invertins mit Begleitstoffen entstehen läßt, als der, wie man hätte vermuten können, energischer verlaufende Abbau des Hefeinhalts bei 30°. Aber weder die Auflösung reichlicher Mengen von Hefegummi, noch die Vergesellschaftung des Invertins mit tryptophanhaltigen [9] Peptiden läßt sich ver-

Tabelle 1.
Verfahren der gebrochenen Freilegung des Invertins unter Neutralisation.

Nr.	Zeitwert der Hefe	Verfahren	Dauer bis zur Abtr. unverd., Std.	Dauer bis zur Abtr. verd., Std.	Inv., Proz. in der Vorfraktion	Dauer der weiteren Freilegung	Inv., Proz. in d. Hauptfraktion	Zeitwert des Hefeausz.
1	18,3	Verfl. d. Tol. u. Aut. bei Zimmertemp. mit Neutral. d. Ammoniak	6	1	30	12	68	1,12
2	18,3	Verfl. u. Aut. bei 30° mit 5% Phopshat + Toluol	1	1	19	20	75	1,15
3	19,7	Verfl. u. Aut. bei 30° mit 10% Phosphat + Toluol	1	2	18	36	68	1,19
4	19,7	Verfl. d. Tol. u. Aut. bei 30° mit Neutralisation	1	2	12	16	76	1,63
5	19,5	dgl.	1	2	9	11	87	1,77

meiden. Mit ähnlichen Abänderungen wie in Tab. 1 sind in weiteren Versuchen (Tab. 2, S. 10) aus sehr invertinreichen Hefen Autolysate gewonnen und teils vorsichtig ohne Alterung, teils nach 1- bis 2tägiger Alterung bei 30° auf Präparate von höherem Reinheitsgrade verarbeitet worden. Die zunächst durch Kaolinadsorption (Verfahren der X. Abhandlung III$_1$, S. 23), sodann mittels Tonerde (so wie im folgenden bei der Verarbeitung der Alkoholfällung beschrieben) gereinigten Präparate wiesen keine bemerkenswerten Unterschiede auf. Sie enthielten 3 bis 5% Tryptophan bei Zeitwerten von 0,24 bis 0,19. Nur die nach den älteren Verfahren durch viel weitergehenden Abbau der Hefezelle gewonnenen und lange gealterten Autolysate ergeben

Invertinpräparate von wesentlich anderer Zusammensetzung, durch starke Millonreaktion ausgezeichnete, verhältnismäßig tryptophanarme.

[10] Tabelle 2.

Invertinpräparate nach mehr oder weniger schonender Ausführung der fraktionierten Autolyse unter Neutralisation.

Nr.	Zeitwert der Hefe	Verfahren	Zeitwert des Autolys.	Alterung	Kaolinadsorption			Tonerdeadsorption		
					A.W.	Elut. Ausb. %	Zeitw. der dial. Elut.	A.W.	dial. Elution Zeitwert	Trypt.%
1	19,7	Verfl. bei 30° ohne Neutr. u. Aut. (18 Std.) bei Zimmertemperatur	2,13	48 Std. bei 30°	0,56	80	0,31	53	0,24	5,3
2	23,0	Verfl. mit Neutr. u. Aut. bei 30° (13 Stunden)	3,25	dgl.	0,51	82	0,22	51	(0,21) 0,23	4,3
3	18,6	Verfl. u. Aut. b. Zimmertemp. (12 Stunden)	1,95	keine	0,18	85	0,22	49	(0,21) 0,24	3,3
4	18,4	Verfl. u. Aut. b. Zimmertemp. (12 Stunden)	1,01	24 Std. bei Z.-T.	0,57	83	0,18	63	(0,157) 0,19	3,0
5	18,4	Verfl. u. Aut. bei 30° mit 10% Phosphat + Toluol (13 Std.)	1,58	10 Tage bei Z.-T.	0,58	65	0,22	43	0,20	—

Die zumeist von uns angewandte Methode (ähnlich wie im Beispiel der X. Abhandlung, S. 20) besteht in der [11] Führung der Brauereihefe zu einem Zeitwert von etwa 20, Abtötung in unverdünntem Zustand mit Toluol bei 30°, Verdünnen mit gleichem Gewicht Wasser nach 1 Stunde und Neutralisieren mit verdünntem Ammoniak, Abtrennung der neutral gehaltenen Vorfraktion nach zwei weiteren Stunden, Freilegung des Invertins in einem Arbeitstag oder einem ganzen Tag bei 30° mit einer Ausbeute von 95% des nach der Abtrennung noch vorhandenen oder ungefähr 85% des gesamten Hefeinvertins. Das mit der doppelten oder vierfachen Wassermenge verdünnte Autolysat wird zunächst mit der Zentrifuge abgetrennt und zweckmäßig erst danach durch geringes Ansäuern mit Essigsäure von Eiweiß vollständig befreit.

Beschreibung: Die neuen Autolysate, deren Zeitwert gewöhnlich zwischen 2 und 1 liegt, sind bei einem Gehalt von 1 S.E. in 40 ccm so gut wie farblose, wasserklare Lösungen, erst nach dem Eindampfen (auf 1 S.E. in 2 bis 4 ccm) grünlichgelb und etwas trüb. Eingetrocknet geben sie hygroskopische, sandfarbige Pulver. Die Millonprobe fällt deutlich aus, aber sie kann allein bei der Dialyse oder bei einer Fällung mit Alkohol oder einmaliger Adsorption mit Kaolin verschwinden.

Ein solches Autolysat vom Zeitwert 1,19 enthielt, bezogen auf Trockengewicht, 7,3% Hefegummi und 1,10% Tryptophan, d. i. auf 1 S.E. 4,35 mg Hefegummi und 0,65 mg Tryptophan. Es wurde unter zweimaligem Wechsel der Fischblase der Dialyse unterworfen, deren Wirkung in 3 Wochen beendet war (Verlust 6%). Die enzymatische Konzentration war aufs dreifache gestiegen (Zeitwert 0,39 bis 0,40), der Tryptophangehalt in Prozenten des Trockengewichtes fast unverändert geblieben (gef. 1,16 und

1,25%), aber berechnet auf 1 S.E. auf $^1/_3$ zurückgegangen (0,23 mg Tryptophan auf 1 S.E.). Die auf 1 S.E. treffende Tryptophanmenge ist also ohne eine weitere Reinigung 4mal kleiner als in den besten Präparaten der VIII. Abhandlung.

Die durch langdauernde Dialyse auf so hohe Zeitwerte gebrachten Autolysate eignen sich nicht mehr für die Anwendung der Kaolinadsorption. Der Adsorptionswert ist zwar hoch (beim angeführten Beispiel 1,12 bei 90% Adsorption), [12] aber infolge von Enzymzerstörung am Kaolin läßt sich keine gute Elutionsausbeute erzielen (gef. 43% in der Elution).

Um mit Invertin künftig zu arbeiten, wird man, wenn Beimischungen von Hefegummi und von Peptiden nicht stören, einfach die hier beschriebenen Autolysate anwenden. Zu Präparaten von höherem Reinheitsgrade gelangt man (ohne langdauernde Dialyse) am einfachsten durch einmalige Adsorption an Kaolin (wie in der X. Abh. S. 23 beschrieben) oder zweckmäßig durch Fällung mit Alkohol und einmalige Adsorption an Tonerde (vgl. VIII. Abh. S. 273 und X. Abh. S. 26). Nur für das letztere Verfahren soll, da es noch verbessert werden konnte, ein Beispiel angeführt werden.

Fällung durch Alkohol: Ein frisch bereitetes Autolysat (1,5 l enthaltend 20,9 S.E., Zeitwert 1,15) wurde auf 0° abgekühlt und mit $^n/_1$-Essigsäure (5 ccm) zu einem p_H von etwa 5 angesäuert. Beim Vermischen mit dem gleichen Volumen auf −20° gekühlten Alkohols fiel eine geringe Menge Niederschlag aus, zu wenig und fein zum Zentrifugieren. Wir saugten die Suspension auf 2 Nutschen durch Filter ab, die mit einer 1 mm dicken Schicht von Kieselgur bedeckt waren. Man konnte den Gur leicht vom Papier ablösen und durch Verrühren mit Wasser eine klare filtrierbare Enzymlösung gewinnen. Sie enthielt in 370 ccm 20,7 S.E. vom Zeitwert 0,45 (unmittelbar — ohne Dialysenverlust — bestimmt).

Tonerdeadsorption: Die Invertinlösung wurde auf 92 ccm eingeengt. Bei dieser hohen Konzentration adsorbierten wir mit 0,40 g Tonerde (in 40 ccm Wasser) 18,7 E. Der Adsorptionswert war schon sehr hoch, nämlich 47 (Verd. 1 S.E. in 6,5 ccm). Das 3mal gewaschene Adsorbat lieferte, in $^1/_2$ l Wasser suspendiert, beim Versetzen mit 4 g Diammonphosphat und Umschütteln in 5 Minuten eine erste Elution, die 13 S.E. enthielt. Der Reinheitsgrad des Präparates war S.W. 7,31 (Zeitwert 0,137), aber infolge von 6% Verlust bei der Dialyse und 8% bei der Elektrodialyse wies es praktisch nur den Zeitwert 0,158 auf. Es war frei von Hefegummi und enthielt 2% Tryptophan.

[13] **II. Fraktionierte Fällung durch Tannin.**

Invertin gibt mit Tannin unter üblichen Bedingungen keine Fällung, selbst bei hoher Konzentration. Ein anderes Verhalten beobachteten wir aber bei tiefer Temperatur. Beim Abkühlen auf 7° tritt Trübung ein, die bei 4° dichter wird und bei 0° die Form eines weißflockigen Niederschlags annimmt, der sich in der Zentrifuge von der Flüssigkeit trennen läßt, die, solange die Temperatur tief ist, milchig bleibt.

Die Fällung ist weniger von der Konzentration des Invertins, als von der des Tannins abhängig; auch verdünnte Invertinlösungen geben bei 0° Niederschläge auf genügenden Zusatz von Tannin. Aber die Abtrennung der Tanninfällung in der Zentrifuge, wobei die niedrige Temperatur beibehalten werden muß, wird durch Anwendung sehr konzentrierter Invertinlösungen (1 S.E. in 1 bis 1,4 ccm) erleichtert. Gleichwie pflanzliche Peroxydase[1] in jedem bisher erreichbaren Reinheitsgrad mit Tannin eine vollständige Fällung gibt, so bildet bei 0° Invertin auch von hohem Reinheitsgrad den Tannatniederschlag z. B. ein Präparat von S.W. 7,3; aus den Mutterlaugen der Niederschläge läßt sich durch vermehrten Zusatz von Tannin das Invertin vollends ausfällen. Eine Trennung in tanninfällbaren und -unfällbaren Anteil erfolgt also nicht. Die Beständigkeit des Invertins gegen Tannin ist bei gewöhnlicher Temperatur ziemlich gering, nur durch rasches Arbeiten bei der tieferen Temperatur gelingt es, die Enzymzerstörung in mäßigen Grenzen zu halten.

In Versuchen bei 20° mit Invertin vom S.W. 1,39 beobachteten wir bei einer Konzentration von 1 S.E. in 20 ccm mit 0,33 g Tannin auf 1 S.E. sofort nach Zusatz des Tannins 8, nach 45 Min. 33, nach 75 Min. 41 % Verlust von Invertin. Als sogleich nach dem Tannin die zur Adsorption erforderliche Menge Tonerde zugesetzt wurde, betrug der Verlust alsbald schon 15, nach 45 Min. 40, nach 75 Min. 50%. In Versuchen bei 0° mit 1 S.E. in 6,5 ccm war der Invertinverlust sofort nur 2, nach 45 Min. 11 %, in 50fach verdünnter Lösung in 45 Min. 13 %. Auch bei 0° war die Enzymzerstörung in der tanninhaltigen Lösung auf Zusatz von Tonerde bedeutend, z. B. in 45 Minuten 37 %.

[14] Es ist bemerkenswert, daß, abgesehen von dieser Enzymzersetzung, die durch rasches Arbeiten einzuschränken ist, und von starker Erniedrigung des Adsorptionswertes das Tannin die Adsorption an Tonerde nicht stört. Man kann daher das Enzym leicht vom Tannin trennen, sei es beim Verarbeiten der Tannatfällung, die in der Kälte aufgelöst und mit Tonerde versetzt wird, oder bei der Isolierung des Invertins aus der Mutterlauge der Fällung, die man behufs Adsorption stark verdünnt. Die invertinhaltige Tonerde aus der Tannatfällung zeigt nur spurenweise Tanninreaktion, beim Verarbeiten der tanninreichen Mutterlauge geht zwar Tannin in die Tonerde mit, aber nicht in die Diammonphosphatelution.

Das Tanninverfahren ermöglicht, den Reinheitsgrad von Invertinpräparaten, an denen die Reinigung mit Kaolin und Tonerde ein Ende erreicht zu haben scheint, noch weiter zu steigern. Aber die Methode, brauchbar für die Abtrennung von Hefegummi, versagt in bezug auf die Beseitigung von Tryptophan. Als wir in 4 Versuchen Invertin mit Tannin fraktioniert fällten, wiesen die einzelnen Anteile, die aus den Niederschlägen gewonnenen mit höheren Saccharasewerten und die aus den Mutterlaugen isolierten mit niedrigeren, im Tryptophangehalt keine bemerkenswerten Unterschiede auf.

Beispiel: 2,5 S.E. eines 5,8% Tryptophan enthaltenden Präparates, dessen S.W. bei 14tägigem Stehen von 7,58 auf 7,04 zurückgegangen war, wurden auf 3,4 ccm eingedampft und auf 0° abgekühlt; auch die Lösung von 0,82 g Tannin in 3 ccm

[1] R. Willstätter und A. Pollinger, III. Abh. über Peroxydase, Ann. der Chem. Bd. 430, S. 269, und zwar S. 282 [1922/23].

stand in Eis. Den Becher einer Zentrifuge füllten wir mit Calciumchloridlösung von —15° und befestigten darin mit Korkstücken ein kleines Zentrifugenglas. In diesem nahmen wir die Fällung vor, um sofort zu zentrifugieren. Den Niederschlag von zäher Konsistenz verrührte man mit Wasser von 0°. Die trübe Flüssigkeit enthielt zufolge der sofort ausgeführten Bestimmung 1,64 E., die Restlösung 0,14 E., der Verlust betrug also 28%. Mit Tonerde wurden bei 0° 1,48 E. adsorbiert und mit Diammonphosphat 1,46 E. eluiert. Für das Invertin der Elution berechnet sich aus der gemessenen Wirkung und dem Trockengewicht nach der Dialyse und Elektrodialyse der [15] S.W. 9,43 (Zeitwert 0,106); infolge kleiner Verluste bei beiden Dialysen besaß aber das Invertin vor der Elektrodialyse nur den S.W. 8,34 und am Ende 8,07. Der Tryptophangehalt war 5,9%.

In drei anderen Beispielen wurde noch die Restlösung durch weiteren Tanninzusatz gefällt und mittels der Tonerdeadsorption gereinigt.

Invertin aus der 1. Tanninfällung.		Aus der Restlösung.	
S.W. 4,54;	Tryptophan 2,7%	S.W. 1,59;	Tryptophan 1,7%
S.W. {5,08; (6,06)	„ 5,9%	S.W. 1,89;	„ 2,2%
S.W. 4,17;	„ 3,7%	S.W. 4,00;	„ 3,6%

III. Methode der fraktionierten Adsorption mit entstehendem Bleiphosphat.

1. Trennung von aktivem und inaktiviertem Enzym.

Es ist bisher nicht gelungen, Saccharase oder ein anderes Enzym von beigemischtem inaktiviertem Enzym zu trennen. Die Adsorption an Kaolin, bei der reinere Enzymlösungen leicht Inaktivierung erleiden, hat, wie einige Beispiele der achten Abhandlung (S. 275) zeigten, nicht erlaubt, den infolge von Enzymzerstörung ungünstig gewordenen Saccharasewert wieder zu steigern. Falls etwa teilweise Trennung von aktivem und inaktiviertem Enzym am Kaolin erfolgt, so wird die Erscheinung überdeckt durch erneute Inaktivierung. Etwas günstiger sind die Erfahrungen mit Tonerde. Es ist wenigstens mit Sicherheit gelungen, den Saccharasewert von Invertin, das durch Inaktivierung am Kaolin sehr stark gelitten hatte (z. B. Präparat 1b und 2b der Tab. 15 der achten Abhandlung), durch Adsorption an Tonerde C und Elution einigermaßen zu steigern (von S.W. 0,161 auf 0,303). Aber bei reineren Präparaten war die Adsorption mit Tonerde C nicht geeignet für die Abtrennung inaktivierter Anteile.

Durch anteilweise Bildung eines adsorbierend wirkenden Niederschlags von Bleiphosphat in den Invertinlösungen (die reineren Präparate werden von Bleiacetat allein auch bei höherer Konzentration nicht mehr gefällt zum Unterschied von [16] den Autolysaten) gelang es in einer Anzahl von Fällen, und zwar in allen, die untersucht wurden, inaktiviertes Invertin von aktivem abzutrennen. Die ersten Fraktionen des Phosphatniederschlages enthielten das wenigst aktive Enzym. Es kam sogar wiederholt vor, daß ein Anteil des Bleiphosphats gar kein aktives, also nur inaktiviertes Enzym adsorbierte. Der Adsorptionswert des Bleiphosphats ist verhältnismäßig hoch,

z. B. wurden von 1 g 8 bis 10 S.E. aufgenommen. Bei anteilweiser Bildung des Niederschlages waren die Adsorptionswerte sehr differierend, mit zunehmender Reinheit des Enzyms steigend.

Der Niederschlag wurde häufig so erzeugt, daß man für einen gewissen Anteil des Enzyms die ausprobierte Menge von Ammonphosphat in die konzentrierte Invertinlösung aus der Bürette einfließen ließ, sodann aus einer zweiten unter heftigem Schütteln die äquivalente Menge Bleiacetat. Der Niederschlag bildet eine feinflockige Suspension, ein kleiner Teil aber blieb milchig und war in der Zentrifuge nicht zu klären. In anderen Fällen ließen wir aus 2 Mikrobüretten abwechselnd sehr kleine äquivalente Mengen von Ammonphosphat und Bleiacetat eintropfen. Dabei entstand eine opalisierende Lösung von Bleiphosphat, das weiterhin nur zum kleineren Teil ausflockte. Nur der letztere Teil war leicht abzutrennen. Die kolloidale Flüssigkeit gab auf Zusatz von etwas Ammonchlorid erst beim Einengen im Vakuum einen invertinhaltigen Phosphatniederschlag. Für die systematische Fraktionierung war das einfachere erste Verfahren das geeignetere.

Eine Nebenerscheinung bei dieser Fraktionierung war die im 3. Abschnitt des Kapitels zu behandelnde Verschiebung des Tryptophangehalts; eine der im Beispiel 4 gewonnenen Invertinfraktionen war vollkommen frei von Tryptophan.

1. Beispiel.

Inaktivierung am Kaolin: Autolysat vom Zeitwert 1,63 wurde mit Alkohol von —20° gefällt. Das so abgeschiedene Invertin war so rein, daß es Adsorption an Kaolin nicht mehr [17] vertrug. Von 32,1 E. wurden 27,4 E. mit 32 g salzsäurebehandeltem Kaolin adsorbiert, aber nur 12,0 E. ließen sich eluieren. Davon adsorbierten wir von neuem 11,4 E. mit 15,3 g Kaolin und vermochten wieder nur 5,7 E. zu eluieren. Nach der Dialyse lagen 5,2 E. vom S.W. 1,59 (Zeitwert 0,63) vor, während ohne Inaktivierung der Saccharasewert mindestens 5, wahrscheinlich 6 betragen hätte.

Fraktionierte Adsorption: Mit 0,1 g Ammonphosphat und 0,43 g Bleiacetat wurden 1,03 E. gefällt, aus der Restlösung mit derselben Menge Phosphat 0,17 E.

Die Elution der vereinigten Bleiphosphatanteile ergab nur 0,424 E. vom S.W. 1,37 mit 2,4% Tryptophan.

Die trübe Restlösung (3,7 E., nach Entfernung des kolloiden Bleiphosphats 3,35 E.) enthielt nach Dialyse und Elektrodialyse nur 2,9 E. vom S.W. 4,0, während ohne die Verluste bei den letzten Operationen S.W. 4,55 (Zeitwert 0,22) erreicht worden wäre. Tryptophan 2,7%.

2. Beispiel.

Inaktivierung durch Aufbewahren. Das Invertin hatte bei monatelangem Aufbewahren mehr als 50% seiner Aktivität verloren; angewandt 13,0 S.E. vom S.W. 1,96 (Zeitwert 0,51).

Fraktionierung: Der erste aus 0,3 g Diammonphosphat und 1,29 g Bleiacetat erzeugte Niederschlag nahm kein aktives Invertin auf, dagegen der zweite aus 0,2 g

Phosphat und 0,86 g Bleiacetat schon 3,58 E. Die Elution daraus lieferte 2,40 E., die bei der Dialyse auf 1,96 E. zurückgingen. S.W. 4,35 (ohne Verlust 5,31).

Zwei folgende Fällungen durch je 0,1 g Diammonphosphat adsorbierten 1,37 und 1,75 E. und lieferten in der Elution 2,08 E., nach der Dialyse 1,73 E. vom S.W. 5,56 (ohne Verlust 6,67).

In der trüben Restlösung waren noch 6,3 E.; beim Stehen flockte ein wenig invertinhaltiges Bleiphosphat aus, danach lagen 5,38 E. vor vom S.W. 5,56 (Zeitwert 0,18).

[18] *3. Beispiel.*

Inaktivierung durch Erwärmen und Elektrodialyse. Aus 23,08 S.E. vom S.W. 4,76 mit 4,2% Tryptophan gingen durch Zersetzung von 84% des Enzyms 3,24 E. vom S.W. 0,70 hervor.

0,1 g Diammonphosphat mit entsprechendem Bleiacetat entfernten 1,32 E., wovon nur 15% eluierbar waren. Nach der Dialyse waren 0,192 E. vom S.W. 0,434 mit 3,6% Tryptophan vorhanden.

Die Restlösung (1,92 E.) erlitt nur bei der Elektrodialyse einen kleinen Verlust, so daß praktisch der S.W. 1,76 erreicht wurde, ohne die neue Inaktivierung 1,93. Tryptophangehalt 5,1%.

4. Beispiel.

20,3 E. von Invertin, das durch 4 Monate langes Aufbewahren in Lösung einen Aktivitätsverlust von 25% erlitten hatte und S.W. 3,13 besaß, wurden 3mal mit 0,1 g Ammonphosphat und Bleiacetat, dann mit 0,2 g gefällt.

1. Frakt. 0,65 E. ads.; eluiert 0,37 E., S.W. 1,35.
2. ,, 2,00 E. ,, ; ,, 1,32 E., S.W. 3,33.
3. ,, 2,1 E. ,, ; ,, 1,87 E., nach Dialyse 1,06 E., S.W. 4,0 (4,35).
4. ,, 5,5 E. ,, ; ,, 2,98 E., nach Dialyse 2,50 E., S.W. 4,54 (5,47).
5. Restlös. mit 10,0 E., nach Eindampfen und Filtrieren 9,67 E., nach Dialyse 8,95 E., S.W. 5,88 (6,25).

Diese Restlösung erlitt beim Stehen und langsamen Erwärmen bis auf 40° einen Wirksamkeitsverlust von 59%. Die noch vorhandenen 3,63 E. vom S.W. 2,32 zerlegten wir in 3 Fraktionen durch zweimalige Niederschlagsbildung mit je 0,05 g Diammonphosphat.

Frakt. 5a. 0,81 E. ads., 0,52 E. eluiert, nach Dialyse und El.-Dialyse 0,385 E. vom S.W. 2,0; Tryptophan 3,5%.

Frakt. 5b. 1,38 E. ads., 0,98 E. eluiert, nach Dialyse und El.-Dialyse 0,66 E. vom S.W. 2,94 (4,35); Tryptophan 2,2%.

Frakt. 5c. Die Restlösung enthielt 1,44 E., nach Eindampfen und Klären 1,35 E. Diese gingen bei der Dialyse auf 1,01 E., bei einstündiger Elektrodialyse auf 0,262 E. zurück. Das Präparat besaß schließlich den S.W. 0,813, es hätte aber ohne die zuletzt erfolgten Inaktivierungen S.W. 4,17 erreicht; Klärung [19] und Filtration waren nicht mehr vorgekommen. Es war frei von Tryptophan.

2. Teilweise Verdrängung des Tryptophans durch zugefügte Peptide.

Nach den vervollkommneten Methoden der Invertingewinnung wird die Freilegung dieses Enzyms mehr und mehr von der allgemeinen Autolyse der Hefe getrennt

und der weitgehende Abbau der Hefemasse vermieden. Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Hefeauszüge enthalten daher 1 S.E. in nur 50 bis 100 mg Trockensubstanz, nach langer Dialyse in nur 20 mg, während in den in unseren ersten Arbeiten ungefähr nach dem Verfahren von C. S. HUDSON (sogenannte rasche, d. h. 4 bis 7 Tage dauernde Autolyse der mit Wasser verdünnten Hefe bei Gegenwart von Toluol) dargestellten Invertinlösungen auf 1 S.E. 10 g Trockensubstanz trafen. Die älteren Autolysate enthielten große Mengen von Eiweißabbauprodukten; beim Abbau vergesellschaften sich namentlich die Millonraktion gebenden Peptide, also wahrscheinlich Tyrosinpeptide, mit dem Invertin. Dadurch war es bedingt, daß das tryptophanhaltige Peptid verhältnismäßig leicht abgetrennt werden konnte, wofür unsere VIII. Abhandlung ein treffliches Beispiel anführte (S. 300). Es ist nicht möglich, dieses Beispiel mit Invertin aus den anders dargestellten Autolysaten zu wiederholen. In den reineren Hefeauszügen gehört das von H. v. EULER und K. JOSEPHSON entdeckte tryptophanhaltige Peptid zu den zähen Begleitern des Enzyms.

Wir untersuchten, ob durch Zusatz eines beliebigen anderen Peptides das tryptophanhaltige aus dem Invertinkomplex verdrängt werden kann und verwandten dafür Leucylglycin, Leucylglycylglycin und Glycyltyrosin. Durch anteilweise Bildung von Bleiphosphat wurden dann die Präparate in Fraktionen zerlegt, die wir hinsichtlich des Tryptophangehaltes verglichen. Mit dem Zusatz von Leucylglycin (auch vom Tripeptid) fiel die Fraktionierung in bezug auf den Tryptophangehalt günstiger aus, als bei der fraktionierten Adsorption mit entstehendem Bleiphosphat allein. Um die einzelnen Fraktionen zu vergleichen, wird der Tryptophangehalt [20] außer in Prozenten der Trockensubstanz auch in Milligramm auf 1 S.E. angegeben.

1. Beispiel.

6,25 S.E. vom S.W. 4,35 enthielten 3,9% Tryptophan, d. i. 0,39 mg auf 1 S.E. Nach Zusatz des gleichen Gewichts, also von 78 mg Leucylglycin fällten wir 2mal mit je 0,1 g Diammonphosphat und entsprechendem Bleiacetat. Das zweite Adsorbat lieferte beim Eluieren 1,69 S.E. vom S.W. 6,54, 2,0% Tryptophan enthaltend, d. i. 0,15 mg pro 1 S.E.

Die Restlösung, durch Zusatz von Ammonchlorid, Eindampfen und Klären von Bleiphosphat befreit, enthielt 2,28 E., nach Elektrodialyse 2,17 E. vom S.W. 4,17 mit nur 0,75% Tryptophan. Sie enthielt noch Leucylglycin und verlor bei 10tägiger Dialyse noch beträchtlich an Trockengewicht, freilich unter gleichzeitiger Enzymzerstörung. Der praktisch erreichte S.W. war 5,03, der auf die ursprüngliche Wirksamkeit berechnete 8,41 (Zeitwert 0,119). Hieraus und aus dem am Ende gefundenen Tryptophangehalt von 2% berechnen sich 0,12 mg auf 1 S.E.

2. Beispiel.

8,5 S.E. vom S.W. 3,57 enthielten 3,5% Tryptophan, d. i. 0,49 mg auf 1 S.E. Von Leucylglycin wurde das Doppelte des Trockengewichts, nämlich 240 mg, zugesetzt. Durch Bildung des Niederschlags von Bleiphosphat in 3 Anteilen erhielten wir folgende Fraktionen:

1. 0,93 E. vom S.W. 2,86, 2,0% Tryptophan d. i. 0,35 mg auf 1 S.E.
2. 2,05 E. vom S.W. 3,45, 5,7% Tryptophan d. i. 0,83 mg auf 1 S.E.
3. 1,59 E. vom S.W. 4,16, 3,4% Tryptophan d. i. 0,40 mg auf 1 S.E.
4. Restlösung, 1,08 E., unter Aktivitätseinbuße, aber ohne Filtrieren dialysiert und elektrodialysiert, erhalten 0,891 S.E. vom wirklichen S.W. 5,99 und vom berechneten S.W. 7,30; Tryptophan 2,7%, d. i. 0,185 mg Tryptophan auf 1 S.E.

3. Beispiel.

Ein Präparat vom S.W. 3,57 mit 0,49 mg Tryptophan auf 1 S.E. lieferte 4 Fraktionen. Die Restlösung hatte den wirklichen S.W. 5,84, während bei verlustloser Dialyse S.W. 7,35 erreicht worden wäre, mit 0,16 mg Tryptophan auf 1 S.E.

3. Tryptophanverschiebung bei der Adsorption.

Durch Adsorption an Kaolin und an Tonerde war es nicht gelungen, die Aggregate der Saccharase mit tryptophanhaltigen Peptiden aufzulösen, ebenso wie nach denselben Adsorptionsverfahren aus manchen gealterten Autolysaten der früheren Methodik kein tyrosinfreies Invertin gewonnen werden konnte. [21] Tryptophanreiches Invertin, das 8, 9 und 9,2% Tryptophan enthielt (VIII. Abh., Tab. 17, Nr. 5 und 6), zeigte gegenüber Aluminiumhydroxyd das Adsorptionsverhalten eines einheitlichen Stoffes. Hingegen führt die fraktionierte Fällung mit entstehendem Bleiphosphat weiter hinsichtlich der Abtrennung der als Koadsorbentien wirkenden kolloiden Bestandteile des Invertinkomplexes. Auch ohne die im voranstehenden Abschnitt beschriebene Einführung substituierender Peptide gelingt es, beim Erzeugen der adsorptiv wirksamen Bleiphosphatfällung in einzelnen, am besten in zahlreichen Anteilen, das Invertin in tryptophanreichere und -ärmere Fraktionen zu zerlegen. Da die Methode oben schon beschrieben wurde, sollen nur einige weitere für die Tryptophanverschiebung bemerkenswerte Beispiele in der Tab. 3 angeführt werden. Ausgangsmaterial mit beispielsweise 0,3 mg Tryptophan auf 1 S.E. wurde in Anteile von S.W. 4,2 mit 0,36 mg und S.W. 9,7 mit 0,18 mg Tryptophan auf 1 S.E. geschieden.

Tabelle 3. Tryptophangehalt von Fraktionen der Bleiphosphatadsorption.

Nr.	Ausgangsmaterial		Fraktion I		Fraktion II (Restlös.)	
	S.W.	mg Trypt. / S.E.	S.W.	mg Trypt. / S.E.	S.W.	mg Trypt. / S.E.
1	1,68	0,54	5,0	—	5,2	0,165
2	3,70	ungef. 0,5	5,4	0,27	5,0	0,17
3	5,17	0,26	7,6	0,38	6,75	0,22
5	5,75	0,30	9,7	0,18	4,18	0,36
4	6,85	0,22	4,35	—	11,0	0,16

Einiges von dem analytischen Material, das seit der Entdeckung des Tryptophans im Invertin durch H. v. EULER und K. JOSEPHSON gesammelt wurde, ist in der umstehenden Tab. 4 zusammengestellt. Daraus ergibt sich, daß mit dem Ansteigen des Saccharasewertes von etwa 4,0 in jenen Stockholmer Präparaten zu den höchsten Werten unserer Präparate nicht eine Zunahme des Tryptophangehaltes Hand in Hand geht. Die Tryptophanmenge auf 1 S.E. wurde im [23] Vergleich zu den Werten von H. v. EULER und K. JOSEPHSON allein nach der Dialyse eines geeigneten Autolysates 2½mal kleiner gefunden, nach einer Tonerdeadsorption 5mal, nach einer Kaolinadsorption aus dialysiertem Autolysat fast 10mal kleiner und bei der fraktionierten Adsorption mit Bleiphosphat kam es vor, daß eine Fraktion vollständig tryptophanfrei war, während sich das Peptid in anderen Fraktionen anreicherte.

4. Beständigkeitsverlust nach fraktionierter Adsorption.

Bei der Adsorption durch entstehendes Bleiphosphat begegnet man in zahlreichen Fällen auffallenden Beständigkeitseinbußen, besonders nach weit fortgeschrittener Fraktionierung. Es läßt sich entscheiden, ob vielleicht das tryptophanhaltige Peptid als kolloider Träger der aktiven Gruppe des Invertins unentbehrlich oder

[22] Tabelle 4. Beispiele von tryptophanreichem und tryptophanarmem Invertin.

Nr.	Zitat	Darstellungsweise des Präparates	Reinheitsgrad		Tryptophangehalt	
			Zeitwert	S.W.	% des Trockengewichts	mg auf 1 S.E.
1	H. v. Euler und K. Josephson, Chem. Ber. Bd. 57, S. 859 [1924],	Kaolin-Tonerde-adsorption	0,27	3,70	4,93	0,667
2	und zwar S. 861		0,25	4,00	5,56	0,695
3	VIII. Abhandlung, Tab. 16, Präparat D	Kaolin-Tonerde-adsorption	0,15	6,67	8,9	0,67
4	VIII. Abhandlung, Tab. 16, Präparat α	Kaolin-Tonerde-adsorption	0,24	4,16	0	0
5	Diese Abhandlung, Abschnitt I	Dialysiertes Autolysat	0,40	2,50	1,25	0,25
6	Unveröffentlicht	Alkoholfällung, Tonerdeadsorpt.	0,37	2,70	0,6	0,11
7	X. Abhandlung, Abschnitt III_2	Dial. Autolys., Kaolinadsorpt.	0,193	5,18	0,7	0,067
8	Diese Abh., Abschnitt III_1, 4. Beispiel, 5c	Restlösung nach Bleifällung	(0,24) 1,23	(4,17) 0,81	0	0
9	Diese Abh., Abschnitt III_2, 1. Beispiel	Restlösung nach Bleifällung	(0,110) 0,198	(8,41) 5,05	2,0	0,12
10	Diese Abh., Abschnitt III_5, 1. Präparat	Restlösung nach Bleifällung	(0,084) 0,20	(11,9) 5,0	3,9	0,16
11	Diese Abh., Abschnitt III_5, 2. Präparat	Restlösung nach Bleifällung	0,103	9,7	3,5	0,18
12	Diese Abh., Abschnitt III_4, 8. Beispiel	Restlösung nach Bleifällung	0,132	7,55	5,8	0,38

wenigstens wichtig für seine Beständigkeit ist. Manche von unseren Beobachtungen schienen darauf hinzudeuten.

1. Beispiel.

Die im 1. Abschnitt, Beisp. 4, erwähnte Restlösung 5c nach weitgehender Fraktionierung mit Bleiphosphat enthielt tryptonphanfreies Invertin vom wahrscheinlichen S.W. 4,17. Bei eintägiger Dialyse betrug der Verlust 26% und bei darauf folgender einstündiger Elektrodialyse 74% des noch vorhandenen Wirkungsvermögens.

Die Annahme einer so wichtigen Funktion des Tryptophankörpers wird aber widerlegt durch Beispiele gleichartiger Zersetzlichkeit bei beträchtlichem Gehalt der Präparate an Tryptophan. Wenn es auch nicht ausgeschlossen ist, daß diesem eine gewisse Schutzwirkung zukommt, so ist sie doch unzulänglich und nicht spezifisch.

2. Beispiel.

Eine Restlösung nach 3 Fällungen von Bleiphosphat enthielt 7,24 E. Invertin vom wahrscheinlichen S.W. 5,16 mit 1,7% Tryptophan (vgl. Tab. 3, Nr. 1). Bei der Dialyse betrug die Abnahme 6, danach bei einstündiger Elektrodialyse 82,5% der noch vorhandenen Wirksamkeit.

3. Beispiel.

Die im 2. Abschnitt, Beispiel 2 beschriebene Restlösung nach der Adsorption durch Bleiphosphat enthielt Invertin vom berechneten S.W. 8,41 [24] mit 2% Tryptophan. Der Verlust bei zehntägiger Dialyse betrug 40%. In jedem derartigen Falle wurde der Dialysator vor und nach der Anwendung auf Dichtheit geprüft.

4. Beispiel.

Auch das bei der Fraktionierung durch Bleiphosphat aus der Fällung eluierte Invertin erlitt Beständigkeitssturz, z. B. eluierten wir aus der 4. Fällung eines derartigen Versuchs 1,38 E.

tryptophanhaltiges Invertin vom berechneten S.W. 5,62; bei dreitägiger Dialyse betrug der Rückgang 46 %.

Es kamen also schon bei mittleren Saccharasewerten (wenig über 5) tryptophanhaltiger Invertinpräparate starke Verluste vor während der Dauer der Dialyse. Auch das Präparat vom höchsten bisher erreichten S.W. (11,9) zeigte bei einem Gehalt von 3,9 % Tryptophan auffallende Unbeständigkeit beim Stehen der wäßrigen Lösung.

5. *Beispiel.*

Durch Bleiphosphat wurden 5,23 S.E. vom S.W. 5,26 in etwa gleiche Teile von Adsorbat und Restlösung geteilt. Die letztere enthielt 2,61 E., die bei zweitägigem Stehen (Verd. 1 E. in 80 ccm) um 52 % auf 1,25 E. zurückgingen. Dazu kamen noch 9 % Verlust bei der Dialyse und 7 % bei der Elektrodialyse. Der wirklich gefundene S.W. war 5,0, während sich 11,9 berechnete. Der Tryptophangehalt betrug 3,9 %.

Die Erklärung für die Unbeständigkeit ist nicht in der hohen enzymatischen Konzentration des zuletzt erwähnten Präparates zu suchen. Die folgenden Beispiele lehren, daß Invertinpräparate vom S.W. etwa 10 die Dialyse und Elektrodialyse ohne die mindeste Einbuße an Aktivität aushalten können.

6. *Beispiel.*

Die Restlösung des Präparats 2 im folgenden Abschnitt enthielt 3,05 E., die bei einer Verdünnung von 1 E. in 17 ccm dialysiert und 2 Stunden elektrodialysiert wurden. Der Enzymgehalt blieb konstant. Das Präparat wies den S.W. 9,70 und 3,5 % Tryptophan auf.

7. *Beispiel.*

Die Restlösung des 3. Präparats von Abschnitt 5 enthielt ähnlich reines Invertin (S.W. 9,62); kein Verlust in der Dialyse (bei Verd. von 1 E. in 22 ccm) und Elektrodialyse.

[25] 8. *Beispiel.*

Eine ähnliche Restlösung nach sehr weitgehender Fraktionierung mit Bleiphosphat enthielt 7,55 E. vom S.W. 7,58 mit 5,8 % Tryptophan. Dialyse und zweistündige Elektrodialyse verliefen verlustlos.

In vielen Fällen beobachtet man mit dem Grad der Verdünnung abnehmende Beständigkeit.

9. *Beispiel.*

Invertin, durch Kaolin- und Tonerdeadsorption gereinigt (Beispiel des Abschnitts III₁ in der zehnten Abh.; S.W. 5,56, Tryptophan 3,9 %), wurde in Lösungen von mittlerer und geringerer Konzentration stehen gelassen.

		1 S.E. in 22,5 ccm	in 225 ccm
nach	4 Tagen	3 % Abnahme	2 % Abnahme
„	11 „	11 „	18 „
„	18 „	17 „	45 „
„	25 „	25 „	78 „

Aber auch diese Regel trügt. Es sind Fälle großer Beständigkeit des Invertins auch in sehr verdünnten Lösungen beobachtet worden.

10. *Beispiel.*

Das Invertin der Restlösung von einer Fraktionierung durch Bleiphosphat (4. Beispiel des 1. Abschn., Frakt. 5) besaß S.W. 5,88. In Verdünnung von 8,8 E. auf 65 ccm blieb die Wirksamkeit 10 Tage konstant, danach wurde auf 1030 ccm verdünnt (also 1 E. auf 120 ccm) und auf 30° erwärmt. Der Rückgang betrug in 2 Tagen 15, in 4 Tagen im ganzen 17 %, in weiteren 10 Tagen trat kein Verlust ein. Bei weiterem Erwärmen bei 40° nahm die Enzymlösung in 2 Stunden um 21, 6 Stunden um 41, 8 Stunden um 51, 12 Stunden um 59 % ab.

In Beispielen, wie im letzten, scheint das entstehende Inaktivierungsprodukt Schutzwirkung auf das Enzym auszuüben. Aber auch dieser Schutz ist unzuverlässig, wie der Verlauf der Inaktivierung im 9. Beispiel erkennen läßt.

Alle Beobachtungen deuten darauf hin, daß das Invertin auf eine kolloide Substanz oder mehrere als Schutzstoffe angewiesen ist, die durch Adsorptionsvorgänge abgetrennt werden können, z.B. mit Bleiphosphat, besonders leicht mit Kaolin. Aber dieser spezifische Schutzstoff ist weder Hefegummi, noch ist er tyrosin- oder tryptophanhaltiges Peptid.

[26] 5. Steigerung des Saccharasewertes durch fraktionierte Adsorption an Bleiphosphat.

Mittels der Adsorption an anteilweise gefälltes Bleiphosphat gelang es in einer Anzahl von Fällen, wenn auch durchaus nicht in allen untersuchten Beispielen, die enzymatische Konzentration von Invertinpräparaten höher zu steigern, an denen sich die Leistungsfähigkeit der bisherigen Methoden erschöpft hatte. Bei den nach den letzten Methoden der fraktionierten Autolyse gewonnenen Invertinlösungen führte die Adsorption an Kaolin und Tonerde im allgemeinen zu S.W. 5,55 und nicht weiter. Nur bei der Adsorption mit Tonerde aus rohrzuckerhaltiger Lösung in Gegenwart von primärem Phosphat ist es in schlecht reproduzierbarer Weise vorgekommen, daß günstigere Saccharasewerte bis zu 8,55 (zehnte Abh., S. 27) erzielt wurden.

Die Höchstwerte nach dem Bleiphosphatverfahren waren S.W. (11,9) bei einem sehr unbeständigen und S.W. 9,6 und 9,7 bei sehr beständigen Präparaten. Ein ähnlich gewonnenes, gleichfalls sehr haltbares Invertinpräparat vom S.W. 7,58 bildete das Ausgangsmaterial für eine oben erwähnte fraktionierte Fällung durch Tannin, wobei es den S.W. (9,41) erreichte.

Bei der neuen Methode hat es keinen Unterschied bedingt, ob das Enzymmaterial durchwegs unversehrt geblieben, oder ob es teilweise Inaktivierung erlitten hatte. Das Beispiel 2, auf dem ganzen Weg vom Autolysat bis zum Ende genau kontrolliert, hatte bei keiner der zahlreichen Operationen eine Aktivitätseinbuße ergeben, hingegen war das Material für Beispiel 3 mehrmals teilweiser Zersetzung anheimgefallen. Unmittelbar vor der Adsorption an Bleiphosphat war bei der Dialyse der Elution aus Tonerde der S.W. von 5,63 auf 4,76 zurückgegangen. Die oben nachgewiesene Abtrennung des inaktivierten Anteils bestätigt sich in diesem Falle wie auch im Beispiel 1.

1. Präparat.

5,23 E. hatten nach Reinigung durch Alkoholfällung, Tonerdeadsorption und Voradsorption durch Tonerde den S.W. 6,67, der sich bei dreitägigem Aufbewahren auf 5,18 verschlechterte. [27] Die Adsorption an Bleiphosphat aus 0,1 g Diammonphosphat und 0,43 g Bleiacetat schied das Invertin in Hälften. Das Adsorbat enthielt 2,64 E. und lieferte beim Eluieren mit Diammonphosphat und Dialysieren 2,0 E. vom S.W. 4,35. Die Restlösung war klar und frei von Bleisalz, sie enthielt nur ein wenig Ammonsalz. Ihr Gehalt betrug 2,61 E., die schon beim Stehen auf 1,25 E., bei der Dialyse und Elektrodialyse auf 1,08 E. zurückgingen (vgl. Abschn. 4, Beispiel 5). Der S.W. betrug nach diesen Verlusten 5,0; da aber keine Trübung eingetreten und keine Filtration vorgekommen war, ließ sich der S.W. 11,9 (Zeitwert 0,084) für die Restlösung mit Sicherheit ableiten.

2. Präparat.

Autolysat vom Zeitwert 1,12 (20 E.) wurde nach 3tägigem Altern bei Zimmertemperatur nach dem Verfahren der dritten Abhandlung ohne Phosphatzusatz mit Bleiacetat gefällt. Die Restlösung, die bleifrei war, enthielt 17,0 E. und wurde der Adsorption mit Tonerde unterworfen. Das Material für die Bleiphosphatfällung betrug 6,75 E. vom S.W. 5,75, 3,4% Tryptophan enthaltend. Mit dem Bleiphosphat aus 0,22 g und 0,33 g Ammonphosphat fielen 1,03 und 2,67 E. aus, die zusammen beim Eluieren Invertin vom S.W. 4,17 lieferten; 3,0% Tryptophan. Die Restlösung enthielt 3,05 E., nach Dialyse und Elektrodialyse 3,02 E., der S.W. betrug 9,70 (Zeitwert 0,103), der Tryptophangehalt 3,5%.

3. Präparat.

10,4 S.E. durch Kaolin und Tonerde gereinigtes Invertin vom S.W. 4,76 (nach 15% Aktivitätsverlust bei der Dialyse) fällten wir 2mal mit je 0,15 g Diammonphosphat und entsprechendem Bleiacetat. Die Adsorbate lieferten nur Invertinpräparate von S.W. 3,71 und 6,26, während das Enzym der Restlösung sich durch höheren Reinheitsgrad und Beständigkeit auszeichnete. Die klare, sofort von Bleiphosphat frei erhaltene Restlösung enthielt 2,15 E., nach Eindampfen, Dialyse und Elektrodialyse ebensoviel vom S.W. 9,62 (Zeitwert 0,104).

[28] Analytische Angaben.

1. Präp. 1,235 mg Substanz gaben 0,007 mg, d. i. 0,54% Asche.
Mikro-Dumas nach PREGL: 2,050 mg Substanz gaben 0,156 ccm (korr.) Stickstoff bei 25° und 718 mm. 8,20% Stickstoff; für aschefreie Substanz berechnet 8,25%.

2. Präp. 2,652 mg Substanz gaben 0,012 mg, d. i. 0,45% Asche.
Mikro-Dumas: 3,995 mg Substanz gaben 0,328 ccm (korr.) Stickstoff bei 23° und 716 mm. 8,92% Stickstoff; berechnet für aschefreie Substanz 8,96%.

3. Präp. Mikro-Dumas: 2,510 mg Substanz gaben 0,220 ccm (korr.) Stickstoff bei 22° und 716 mm; 9,52% Stickstoff.

Einige andere Präparate von S.W. ungefähr 5 aus der fraktionierten Adsorption an Bleiphosphat ergaben bei der Elementaranalyse, für deren Ausführung wir Herrn Privatdozenten Dr. RICHARD KUHN zu Dank verpflichtet sind, keine bemerkenswerten Unterschiede im Kohlenstoffgehalt gegenüber der Zusammensetzung älterer Präparate, z. B solcher der III. Abhandlung vom S.W. 2,0, 1,17, 5,0 und 3,45. Dagegen waren die Unterschiede im Stickstoffgehalt sehr groß. Diesbezüglich ist an früher mitgeteilte Stickstoffgehalte zu erinnern, z. B. von 17,5 und 12,7% (Präp. *m* und *l* der dritten Abh. S. 44) und 4,8 (Präp. Nr. 10 der Tab. 17 der achten Abh.) bei Saccharasewerten von 3,45, 5,0 und 4,17. Im Gegensatz zu den Invertinpräparaten der dritten Abhandlung, bei deren Verbrennung zähflüssige Destillate auftraten, zeigten die letzten Präparate nur Verkohlung. Die gebildete Kohle verbrannte verhältnismäßig leicht.

Für die Analysen wurden die Präparate bei 110° und 20 mm Druck getrocknet.

4. Präp. vom praktischen S.W. 5,0 (ber. S.W. 5,38), 2,9% Tryptophan; schwerst adsorbierbarer Anteil einer Fraktionierung.
Nach PREGL gaben 3,722 mg Substanz 0,035 mg Asche, 6,27 mg CO_2 und 2,43 mg H_2O; Mikro-Dumas: 4,295 mg Substanz gaben 0,397 ccm (korr.) Stickstoff bei 27° und 716 mm.

5. Präp. vom praktischen S.W. 4,55 (ber. S.W. 5,0). 1,7% Tryptophan; leichtest adsorbierbarer Anteil derselben Fraktionierung.

Nach PREGL gaben 3,512 mg Substanz 0,301 mg Asche, 5,175 mg CO_2 und 2,00 mg H_2O; Mikro-Dumas: 4,815 mg Substanz gaben 0,342 ccm (korr.) Stickstoff bei 24° und 719 mm.

[29] Belege für die letzten Beispiele.

Präparat	Bestimmung unter Bed. des Vergleichszeitwertes nach WILLSTÄTTER u. STEIBELT[1]				Zeit für 50% Spaltung	Vergleichszeitwert · 10⁴	S.W.
	mg Trockensubstanz ang. f. 25 ccm Best.-Lösung	Zeit in Min.	Drehung in Grad	Spaltung in %			
1. Beispiel (1. Präp.)							
Ausgangsmaterial	0,0015	5,0	1,80	51	4,95	9,03	6,67
		8,0	0,46	70,2			
Dasselbe nach 3 Tagen	0,066	7,2	2,45	41,2	8,75	11,6	5,18
		10,1	1,40	57,9			
Restlösung	(0,0142)	15,1	2,28	43,7	17,8	(5,02)	(11,9)
		19,9	1,45	55,7			
Dieselbe nach 2 Tagen	(0,0284)	10,9	3,02	32,9	18,4	(10,4)	(5,79)
		20,6	1,42	56,1			
Nach Dialyse und Elektrodialyse	0,0713	9,0	1,64	53,0	8,45	12,02	5,00
		10,4	1,05	61,7			
2. Beispiel (2. Präp.)							
Autolysat	0,583	6,8	1,34	57,4	5,8	67,5	0,893
		8,6	0,21	73,8			
Nach Tonerdeadsorption	0,0832	6,7	1,59	53,7	6,3	10,5	5,75
		8,9	0,80	65,3			
Restlösung nach Dialyse und Elektrodialyse	0,0393	7,9	1,84	50,0	7,9	6,22	9,70
		12,8	0,47	70,2			
3. Beispiel (3. Präp.) Restlösung nach Dialyse und Elektrodialyse	0,0163	17,8	2,10	46,2	19,3	6,28	9,62
		23,3	1,25	58,7			
4. Beispiel (Beisp. Abschn. II, Tanninfällung)							
Elution aus Tonerde	(0,0458)	6,2	2,15	45,5	6,95	(6,38)	(9,43)
		8,1	1,27	58,4			
Dieselbe nach Dialyse	(0,0533)	6,4	2,03	47,3	6,75	(7,24)	(8,34)
		9,3	0,87	65,7			
Dieselbe nach Dialyse und Elektrodialyse	0,044	7,4	2,21	44,7	8,5	7,45	8,07
		10,8	0,89	63,9			

[30]

4. Präparat		5. Präparat	
Asche = 0,94%	aschefreie Subst.	Asche = 8,57%	aschefreie Subst
C = 45,96	C = 46,30%	C = 40,20	C = 43,96%
H = 7,30	H = 7,38	H = 6,37	H = 6,97
N = 9,90	N = 9,99	N = 7,72	N = 8,44

In dieser Arbeit erfreuten wir uns vortrefflicher Unterstützung durch Herrn GERHARD KÜNSTNER, dem wir unseren aufrichtigen Dank aussprechen.

[1] Diese Bestimmungen wurden gewöhnlich mit der 4fachen Menge in 100 ccm Bestimmungslösung, enth. 4,75 g Rohrzucker, ausgeführt. Davon dienten je 25 ccm, mit 5 ccm 2 n-Soda gestoppt, für die einzelne Ablesung. Aus der Halbdrehungszeit ergibt sich der Vergleichszeitwert (R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 111, S. 157, und zwar S. 169 [1920]; Bd. 115, S. 211, und zwar S. 214 [1921]) durch Multiplikation mit der Trockensubstanz in 25 ccm und Division durch 500, ferner der Zeitwert gemäß der Bestimmung nach C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON (III. Abh., Diese Zs. Bd. 123, S. 1, und zwar S. 23 u. 24 [1922]) durch Multiplikation mit der Trockensubstanz in 100 ccm Ansatz und mit dem Faktor $\frac{41,5}{500} = 0,083$.

Bisher unveröffentlicht.

58. ZUR FREILEGUNG DES INVERTINS AUS DER HEFE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und WOLFGANG GRASSMANN.

Eine Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[1] über die Isolierung des Invertins aus der Hefe hat zu dem Ergebnis geführt, daß das Invertin in der Hefezelle in freier, löslicher Form vorhanden ist. „Es ist nicht oder nur locker an Bestandteile des Zellinhalts oder der Zellwand adsorbiert, . . . aber durch eine mechanische Einrichtung, durch einen örtlichen Schutz, vor der Diffusion völlig geschützt." Daher „verläßt das Invertin weder die lebende, noch die abgetötete Hefezelle, so lange ihre Membran nicht abgebaut ist". „Die zuckerhydrolysierenden Enzyme lassen sich daher auf zwei Weisen aus der Hefe isolieren und in Lösung überführen: aus der in der Form unversehrten Zelle durch enzymatische Freilegung, die im Polyoseabbau besteht, und rein mechanisch, nicht einfach durch Aufreißen oder Zerkleinern der Zelle, sondern durch die völlige Zerstörung der Zellstruktur."

Es gelang in jener Arbeit, die invertinfreilegenden Enzyme der Hefe abzutöten, z. B. durch Behandeln der frischen Hefe mit Essigester in der Wärme, so daß kein Herauslösen des Invertins durch autolytische Vorgänge mehr möglich war. Dann ließen sich die so abgetöteten Hefezellen sogar durch fremde Proteasen, Pepsin oder Trypsin, weitgehend entleeren, ohne daß zugleich Invertin in Lösung ging. „Der Eiweißinhalt der Hefe wird dadurch mit dem Erfolge abgebaut, daß über $^2/_3$ bis zu $^3/_4$ der Hefe-Trockensubstanz in Lösung übergeführt werden, während die Rückstände der Hefezellen die rohrzuckerinvertierende Wirkung unvermindert oder fast unvermindert besitzen." Die proteolytisch entleerte Hefe lieferte schließlich ihr Invertin in wäßrige Lösung bei der Einwirkung von kohlehydratabbauenden Enzymen, von Tannase und von Malzamylase. Die ganze Menge Invertin ließ sich den Heferesten so entziehen, zugleich mit sehr großen Mengen Hefegummi.

Aus diesen Beobachtungen war zu schließen, daß die enzymatische Freilegung des Invertins in dem Abbau einer das Invertin abschließenden Membran besteht. Die Zerstörung dieser Membran kann nun nicht nur durch Diastasewirkung erfolgen. Wir sind von Herrn LEO WALLERSTEIN, Besitzer der Wallerstein Laboratories in New York, der unsere Untersuchungen schon wiederholt mit wertvollen Anregungen und

[1] Ann. d. Chem. **427**, 111 [1921/22].

Materialien gefördert hat, auf die Anwendbarkeit des Papains für den gleichen Zweck hingewiesen worden. In der Tat wird gemäß den nachstehenden Versuchen aus der durch Trypsin- oder Pepsinwirkung entleerten Hefe die Saccharase durch Papain, das nicht etwa amylasehaltig ist, ähnlich wie durch Malzamylase freigelegt und in Lösung übergeführt. Papain leistet hier also einen Abbau, der mit Trypsin oder Pepsin nicht erzielt werden konnte. Die schützende Schicht wird also sowohl durch proteolytische wie durch diastatische Einwirkung angegriffen.

H. KRAUT, F. EICHHORN und H. RUBENBAUER[2] haben vor kurzem eine Untersuchung „Über eine Darstellung des Hefegummis durch enzymatischen Abbau und über den Nachweis eines hefegummi-spaltenden Enzyms der Hefe" veröffentlicht. Sie kamen darin zu dem Schluß, daß bei der beschriebenen Proteolyse oder Amylolyse auch noch Hefeenzyme mitwirken, welche bei der Abtötung der Hefe durch Essigester (37°) die Vernichtung der eigentlichen Freilegungsenzyme überdauert haben.

Versuche mit Papain.

Versuch I.

Abtötung. 300 g Löwenbräuhefe (Trockengew. 74,9 g), 4,04 S.E. enthaltend, wurden durch 45 ccm Essigester bei 37° verflüssigt, bei dieser Temperatur $1^1/_2$ Stunden gelassen und über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Am nächsten Tage enthielt die Suspension (305 ccm): 3,63, der abfiltrierte Verflüssigungssaft: 0,525 S.E.

Entleerung durch Trypsin. Die Hefe wurde vom Verflüssigungssaft abgetrennt, zweimal mit je 200 ccm Wasser gewaschen, darauf in 300 ccm Wasser suspendiert und mit 3 g Pankreatin Merck unter Zusatz von 10 g Natriumacetat und 30 ccm Toluol 7 Tage lang bei 30° digeriert. Nach Ablauf dieser Zeit enthielt die Suspension noch 3,05, das Filtrat nur 0,317 S.E. Die Proteolyse hatte 40,9 g Trockensubstanz in Lösung gebracht.

Entleerung durch Papain. Nach gründlichem Waschen mit Wasser versetzten wir die Heferückstände mit Papain, nämlich 0,75 g Succ. Caricae (Merck), und füllten sie zum früheren Volumen auf. Die Einwirkung geschah bei 30°. In vier Tagen gingen 1,53, in 10 Tagen 2,40 S.E., d. i. fast die gesamte Menge, in Lösung, deren Zeitwert 65 war. Die Flüssigkeit enthielt viel Hefegummi; sie gab keine Millonreaktion, aber starke Ninhydrinprobe. Die folgende Übersicht enthält vollständigere Zahlenangaben über den Verlauf des Versuches.

Übersicht.

	Invertingehalt der ganzen Suspension		Invertingehalt der Lösung			Trockensubstanz in Lösung	
	S.E.	Proz. d. angew. Menge	S.E.	Proz. der Anfangsmenge	Proz. der jeweils vorhand. Menge	g	Proz. d. angew. Menge
Nach Verflüssigung	3,63	90	0,525	13	14,5	23,6	31,5
Nach Einw. von Trypsin	3,05	75	0,317	8,7	10,4	40,9	54
Nach Einw. von Papain (4 Tage)	2,53	62	1,53	38	60	—	—
Nach Einw. von Papain (10 Tage)	2,49	61	2,40	59	96	7,9	10,5

[2] Ber. d. D. Chem. Ges. **60**, 1644 [1927] (*Abhandl. 60*).

Versuch II.

200 g Hefe mit 2,92 S.E. und 47,2 g Trockengewicht wurden verarbeitet. Der Unterschied gegenüber dem ersten Versuch bestand in der Anwendung der doppelten Menge Papain, bezogen auf die Gewichtseinheit der Hefe. Die erhaltene Invertinlösung hatte den Zeitwert 69, sie gab starke Ninhydrin-, sehr schwache Millonreaktion.

Übersicht.

	Invertingehalt der ganzen Suspension		Invertingehalt der Lösung			Trockensubstanz in Lösung	
	S.E.	Proz. d. angew. Menge	S.E.	Proz. der Anfangsmenge	Proz. der jeweils vorhand. Menge	g	Proz. d. angew. Menge
Nach Verflüssigung	2,61	89	0,361	12,4	14,8	14,7	31
Nach Einw. von Trypsin (4 Tage) .	2,18	74	0,296	10,1	13,6	24,6	52
Nach Einw. von Papain (4 Tage) .	1,96	67	1,96	67	100	6,9	14,5

Versuch III.

Anwendung von blausäureaktiviertem Papain (unter freundlicher Mitwirkung der Herren Dr. H. KRAUT und Dr. F. RUBENBAUER ausgeführt).

500 g Hefe, die etwa 9 S.E. enthielten, behandelten wir bei 37° 1 1/2 Stunden lang mit 80 ccm Essigester. Nach dreistündigem Stehen wurde die Hefemasse abzentrifugiert und wiederholt gründlich ausgewaschen. Mit dem Verflüssigungssaft waren 25,1 g Trockensubstanz (21,4% der angewandten 117 g) entfernt worden.

Die proteolytische Entleerung erfolgte mit Pepsin (5 g Peps. pulv. solub. Merck) und zwar in 7 Tagen bei 30° in einem Volumen von 800 ccm bei Gegenwart von 50 ccm Toluol. In Lösung gingen 28,5 g Trockensubstanz (24,3% d. angew. Menge), die Heferückstände enthielten noch 6,85 S.E., also 76% der Anfangsmenge. Sie wurden in 450 ccm suspendiert und für Parallelversuche mit und ohne Blausäureaktivierung geteilt.

A. 395 ccm Hefesuspension, 6,01 S.E. enthaltend, verdünnten wir auf 660 ccm und behandelten sie mit 1,35 g Papain ohne Aktivierung. In 38 Stunden gingen 2,58 S.E. (43%), in 86 Stunden 3,92 S.E. (65% der vorhandenen Menge) in Lösung.

B. Auf 1/10 des ganzen Ansatzes, also 45 ccm mit 0,685 S.E., ließen wir 0,15 g Papain, diesmal nach Vorbehandlung mit 150 mg Cyanwasserstoff, im Volumen von 75 ccm einwirken. Nach 86 Stunden enthielt die abfiltrierte Lösung die ganze Menge Invertin, nämlich 0,695 S.E. Das Trockengewicht der entstandenen Enzymlösung betrug 2,02 g; zieht man die Masse des angewandten Papains ab, so ergibt sich, daß bei der letzten Operation etwa 16% der Hefesubstanz in Lösung gegangen waren. Die Flüssigkeit gab keine Millonreaktion; aber sie lieferte einen Niederschlag mit Phosphorwolframsäure, auch war die Diazoreaktion positiv.

Die Aktivierung des Papains durch Blausäure hat die Freilegung des Invertins beschleunigt.

21. Oktober 1927.

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 59, S. 1591 [1926].

59. ZUR FRAGE DER PROTEIN-ARTIGEN NATUR DER SACCHARASE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER.

(Eingegangen am 15. Juni 1926.)

Hinsichtlich der Schlußfolgerungen, die sich aus den Analysen zahlreicher und verschiedenartiger Präparate von Saccharase ziehen lassen, suchen die an der Arbeit beteiligten Forscher, wie die Mitteilung „Saccharase (VI.)" von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] zeigt, Übereinstimmung zu erzielen. [1592] Es wird von Nutzen sein, die Ansichten über die Bedeutung der Proteinsubstanzen für die Zusammensetzung der Saccharase und anderer Enzyme noch schärfer auszudrücken, damit noch bestehende Unterschiede in den Auffassungen zu klärenden weiteren Analysen anregen können.

Meine Versuche zur Reinigung der Saccharase waren von dem Gedanken geleitet, das Enzym immer von denjenigen Begleitstoffen zu befreien, die auf Grund von Analysen weniger reiner Präparate als wesentlich für die Zusammensetzung und Natur des Enzyms galten. Jede neue Hypothese über den chemischen Aufbau der Saccharase rief neue Fragen für die präparative und analytische Arbeit hervor und wurde deshalb dankbar aufgenommen und verfolgt. Die Enzympräparate wurden planmäßig von den einzelnen Bestandteilen, deren Bedeutung für die Zusammensetzung des Enzyms zur Erörterung stand, mehr und mehr, bis zur Bedeutungslosigkeit, befreit. Dabei gelang es zwar nicht, beispielsweise die Saccharase von allen nachweisbaren Begleitstoffen ganz zu befreien, aber doch immer von denjenigen, auf die es gerade ankam. Das Ergebnis war, daß sich die Saccharase von chemisch definierbaren hochmolekularen Stoffen, wie Kohlehydraten, Phosphorverbindungen und Proteinsubstanzen, ohne Einbuße an Aktivität, sogar an Beständigkeit, gänzlich oder fast ganz befreien ließ. Für den Aufbau der Saccharase unentbehrliche kolloide Stoffe sind analytisch noch nicht definiert worden.

Im Folgenden soll nochmals geprüft werden, ob es berechtigt ist, den tryptophan-haltigen Begleitstoff der Saccharase nach H. v. EULER und K. JOSEPHSON zu den Bestandteilen des Enzyms, zu den Bausteinen des „gewaltigen Enzym-Moleküls", zu zählen und ihm eine biologisch wichtige Rolle zuzuschreiben, oder aber ob die tryptophan-haltige Substanz, wie es meine Folgerung aus den veröffentlichten

[1] B. 59, 1129 [1926].

Analysen war, ein für die Natur der Saccharase bedeutungsloser Begleitstoff, so etwa wie Hefegummi, ist.

Meine III., IV. und V. Arbeit[2] über Invertin führten als eine nützliche Vorbereitung für die Anwendung der Adsorptionsmethode das Altern der Hefe-Autolysate ein; der proteolytische Abbau veränderte die Saccharase-Begleiter derart, daß das Adsorptionsverhalten günstiger wurde, die Adsorptionswerte bedeutend anstiegen. Den so gewonnenen Präparaten war aber ein früher nicht zu beobachtender hoher Gehalt an Proteinsubstanzen eigen, die durch die Millonprobe gekennzeichnet waren. Dies waren so reichlich und hartnäckig anhaftende Begleitstoffe, daß ihre Beseitigung als eine Probe auf die Abtrennbarkeit der Proteinsubstanzen gelten konnte. Quantitative Versuche über die Millonreaktion lehrten dann (Abhandlung V und VIII[3]), daß bei neutraler Reaktion gewonnene, frische Autolysate und daraus bereitete Präparate völlig frei von den für die Millonreaktion verantwortlichen, vermutlich tyrosin-haltigen Begleitern waren.

Von da an suchten wir die Autolysate immer rascher zu bereiten und in frischem Zustand zu verarbeiten. Solches Material war in unseren Händen, als H. v. EULER und K. JOSEPHSON[4] den Tryptophan-Gehalt ihrer [1593] Saccharase-Präparate entdeckten. Die Stockholmer Präparate von S.W. 3,7 und 4,0 enthielten 4,93 und 5,58%, die Präparate meines Laboratoriums (Abhandlung VIII[5]) von S.W. 6,67 und 3,57 sogar 8,9 und 9,2. Dazu kam später ein Präparat (Abhandlung X[6]) vom S.W. 8,55 mit 8,6% Tryptophan und Präparate (Abhandlung XII[7]) von S.W. 8,4, 11,9 und 9,7 mit Tryptophan-Gehalten von 2,0, 3,9 und 3,5%. Zum Zwecke des Vergleichs schlug ich vor, die analytischen Angaben, z. B. Gehalte an Hefegummi, am Träger der Millonreaktion, an tryptophan-haltiger Substanz auf 1 S.E. zu beziehen. So berechnet, betragen die Tryptophan-Mengen in den erwähnten letzten Saccharase-Proben (0,12, 0,16 und 0,18 mg auf 1 S.E.) nur $^1/_4$ bis $^1/_8$ von den Werten der Stockholmer und Münchener Präparate des Jahres 1924.

Es ist auch daran zu erinnern, daß schon ein allerdings weniger gutes, weitgehend inaktiviertes Präparat meiner I. Arbeit[8] über Invertin von Tryptophan frei war, und auch wiederholt wohldefinierte, gute Saccharase-Proben von Tryptophan quantitativ befreit wurden, nämlich ein Präparat der Abhandlung VIII vom direkt bestimmten S.W. 4,16 und eines der XII. Abhandlung vom indirekt bestimmten S.W. 4,17. Es sollte genügen, in irgendeinem Falle Saccharase ohne Tryptophan darzustellen, um die Belanglosigkeit dieses Bestandteils zu erweisen.

[2] R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN, H. **123**, 1 [1922]; R. WILLSTÄTTER und W. WASSERMANN, H. **123**, 181 [1922]; R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER, H. **133**, 193 [1923/24].

[3] H. **133**, 193, und zwar S. 224 [1923/24]; H. **142**, 257, und zwar S. 291 [1924/25].

[4] B. **57**, 859 [1924].

[5] R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER, H. **142**, 257 [1924/25].

[6] R. WILLSTÄTTER, K. SCHNEIDER und E. BAMANN, H. **147**, 248 [1925], und zwar S. 274.

[7] R. WILLSTÄTTER, K. SCHNEIDER und E. WENZEL, H. **151**, 1 [1925/26], und zwar S. 22.

[8] R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, A. **425**, 1 [1920/21]; vgl. R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER, H. **142**, 257 [1924/25], und zwar S. 304.

Der Forderung von H. v. EULER und K. JOSEPHSON, es müßten zur Abtrennung des Tryptophans, um dessen Entbehrlichkeit erkennen zu lassen, reproduzierbare Methoden angegeben werden, war damit noch nicht genügt. Aber unsere Erfahrungen weisen doch auf einen neuen Weg hin, der sicher zu Saccharase-Präparaten von niedrigem, praktisch bedeutungslosem Tryptophan-Gehalt führt.

Die Vermehrung des Enzyms in der Hefe nach dem Verfahren der Gärung bei niedrigster Zucker-Konzentration von R. WILLSTÄTTER, CH. D. LOWRY und K. SCHNEIDER (Abhandlung IX[9]) lieferte uns Hefen mit 15- bis 20mal mehr Saccharase, aber nach den Analysen der Abhandlung X[10] mit unverändertem Tryptophan-, überhaupt Eiweiß-Gehalt. Während wir in Münchener Bierhefe auf 1 S.E. 150 mg Tryptophan, in den zugehörigen Autolysaten 68 bis 76 mg antrafen, betrug das Tryptophan in invertin-reicher Hefe 13, im Autolysat nur 2,5 mg auf 1 S.E. Und allein die Dialyse genügte, um von dieser Tryptophan-Menge mehr als 90% zu entfernen und uns ein Ausgangsmaterial von S.W. 2,5 mit nur 0,23 mg Tryptophan auf 1 S.E. (1,16 und 1,25% der Trockensubstanz) in die Hände zu geben. Da in den maßgebenden Präparaten des Stockholmer Laboratoriums 0,67 und 0,70 mg auf 1 S.E. trafen, so ist der Tryptophan-Gehalt des neuen Ausgangsmaterials, noch ehe die Reinigung mittels einer der Adsorptionsvornahmen begann, nur $^1/_3$ von demjenigen der früheren guten Präparate, nicht einmal der tryptophan-reichsten.

[1594] Wenn ich auch an diesem Punkte die Arbeit abzubrechen genötigt war, so darf ich doch auf die Methode hinweisen, nach der man dieses neuartige Ausgangsmaterial verarbeiten muß, um auf einfache Weise das Tryptophan noch weitergehend abzutrennen. Die aus invertin-reichster Hefe durch „gebrochene Freilegung unter Neutralisation" gewonnenen Autolysate sollen vor der Dialyse der Alterung unterworfen werden, wobei erfahrungsgemäß der tryptophan-haltige durch andere Begleitstoffe verdrängt wird. Dann ist nach einer Dialyse von sehr langer Dauer die Reinheitssteigerung durch Adsorptionsmethoden auszuführen.

Es erscheint als nicht unbedenklich, Folgerungen hinsichtlich des Stickstoff-, Schwefel-, Protein-Gehaltes u. dgl. auf Analysen der Präparate von If = 303 und 320, d. i. S.W. 6,5 bis 6,9, zu gründen, nachdem doch der Reinheitsgrad der Saccharase bis auf Saccharasewerte von 10 bis gegen 12 gesteigert worden ist.

Die Steigerung des Reinheitsgrades hat noch nicht zu dem Ende geführt, daß ein Enzym in einem für die Analyse geeigneten Zustand vorlag. Immerhin ist die Adsorptionsmethode so leistungsfähig geworden, daß außer allen möglichen, chemisch nachweisbaren Begleitstoffen auch so hartnäckig anhaftende, wie es inaktiviertes Enzym ist, abgetrennt werden konnten. Aus dem Adsorptionsverhalten der reinsten Saccharasepräparate läßt sich schließen, daß sie schon einen hohen Bruchteil von Enzym enthalten.

[9] H. **146**, 158 [1925]. [10] H. **147**, 248 [1925], und zwar S. 259.

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 60, S. 1644 [1927].

60. ÜBER EINE DARSTELLUNG DES HEFEGUMMIS DURCH ENZYMATISCHEN ABBAU UND ÜBER DEN NACHWEIS EINES HEFEGUMMI-SPALTENDEN ENZYMS DER HEFE.

Von H. KRAUT, F. EICHHORN und H. RUBENBAUER.

(Aus dem Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.)

(Eingegangen am 28. Mai 1927.)

Die Darstellung des Hefegummis nach E. SALKOWSKI, die das Ausgangsmaterial der voranstehenden Untersuchung über die Reinigung des Hefegummis durch Adsorption lieferte, verwendet zur Zerstörung der Zellstruktur die Erwärmung mit 3proz. Natronlauge. Gegen diese Behandlung ist eine Reihe von Polysacchariden empfindlich, und es erschien zweifelhaft, ob der von uns gereinigte Hefegummi nicht schon durch diesen ersten Schritt seiner Darstellung denaturiert worden war. Es gibt nun ein viel schonenderes Verfahren, den Hefegummi aus der Zelle in Freiheit zu setzen, nämlich den enzymatischen Abbau der Hefe, wie ihn R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[1] in der II. Abhandlung zur Kenntnis des Invertins beschreiben. Wir haben daher nach diesem Verfahren Hefegummi bereitet, durch Adsorption gereinigt und die Identität mit dem Salkowskischen, nach dem Verfahren der vorangehenden Abhandlung* gereinigten festgestellt.

Überläßt man Hefe nach schonender Abtötung durch Toluol sich selbst, so geht durch das regellose Spiel der Enzyme mit dem Hefegummi allmählich die Mehrzahl der Hefe-Inhaltsstoffe in Lösung. Daher ist die totale Autolyse für die Darstellung des Hefegummis ungeeignet. Zweckmäßiger ist es, durch Abtötung eines Teiles der Hefe-Enzyme mit Essigester von 37° die Autolyse hintanzuhalten und durch Zusatz anderer Enzyme eine fraktionierte Entleerung der Hefe vorzunehmen. WILLSTÄTTER und RACKE haben dieses Verfahren eingeschlagen, um zu entscheiden, welcher Teilvorgang innerhalb der gesamten Autolyse die Freilegung des Invertins bewirkt. Sie fanden, daß man nach Abtötung mit Essigester von 37° die Hefe durch Pepsin oder Trypsin von fast der Hälfte der Inhaltsstoffe befreien kann, ohne daß Invertin dabei in Lösung geht. Dann läßt sich durch Diastase das Invertin zusammen mit

[1] A. 427, 111 [1921]. * *Abh. 27.*

dem Hefegummi in Freiheit setzen. Nach einer privaten Mitteilung des Hrn. Geh. Rat R. WILLSTÄTTER* kann man die Freilegung von Invertin und Hefegummi statt durch Diastase auch durch die pflanzliche Protease Papain bewirken.

Durch die Abtötung der Hefe mit Essigester von 37° werden ca. 25% der Trockensubstanz in Lösung übergeführt, darunter nur geringe Spuren von Hefegummi. Die folgende Verdauung mit Pepsin (auf 1 kg frischer Hefe, enthaltend 250 g Trockenhefe, ließen wir z. B. 1 g Pepsin Merck in lamellis 10 Tage bei 30° einwirken) entleerte weitere 40% des Trockengewichtes aus der Hefe, darunter gar keinen Hefegummi. Die Freilegung des Hefegummis gelingt sowohl mit Papain (mit oder ohne aktivierende Blausäure[2]), als auch mit Diastase.

Verdauung mit nicht aktiviertem Papain: 500 g Hefe von 117 g Trockengewicht wurden mit Essigester von 37° behandelt, zentrifugiert, der Rückstand mit Pepsin verdaut, wonach noch 40% des Trockengewichts vorhanden waren. 2,5 g Succus [1645] Caricae Papayae entleerten daraus in 14 Tagen bei 30° 10,3 g = 9% der Trockenhefe. Davon waren 4,5 g = 44% Hefegummi. Der unverdauliche Rückstand enthielt noch 1,0 g Hefegummi.

Verdauung mit aktiviertem Papain: 1 kg mit Pepsin entleerter Hefe wurde mit 2 g Succus und 20 ccm 1 proz. Blausäure bei 30° 16 Tage verdaut. Es gingen 19 g = 8% der Trockenhefe in Lösung. Sie enthielten 5,5 g = 29% Hefegummi. Im unverdaulichen Rückstand befanden sich 4,4 g Hefegummi.

Verdauung mit Diastase: Käuflichen diastatischen Malzextrakt befreiten wir durch 8tägige Dialyse gegen fließendes Wasser von der großen Menge begleitender Kohlehydrate. Wir versetzten 500 g pepsin-verdaute Hefe mit dem dialysierten Malzextrakt, der 12,5 g Trockensubstanz enthielt. Durch die Verdauung vermehrte sich das Trockengewicht um 7,8 g = 6% der Trockenhefe, wovon 5,5 g = 70% Hefegummi waren. Der Rückstand war frei von Hefegummi.

Es ist auffallend, daß vom aktivierten Papain weniger Hefegummi, ja sogar insgesamt weniger Trockensubstanz in Freiheit gesetzt wird, als von Papain ohne Blausäure. Dieses Ergebnis spricht für eine Mitwirkung von überlebenden Hefe-Enzymen, da man die schlechtere Freilegung durch das weit stärker (nämlich auch Peptone) spaltende System Papain + Blausäure wohl nur mit der Vergiftung von Hefeenzymen durch die Blausäure erklären kann. Während WILLSTÄTTER und RACKE wegen der geringen Beständigkeit des Invertins 37° bei der Abtötung der Hefe mit Essigester nicht überschreiten konnten, waren wir in der Lage, Verdauungsversuche nach vollständiger Abtötung aller Hefe-Enzyme durch 1stdg. Kochen der Hefe mit Essigester vorzunehmen. Sie zeigten das interessante Resultat, daß nun Pepsin überhaupt nicht mehr verdaute. Papain setzte 40% der Trockensubstanz in Freiheit, immerhin viel weniger als bei noch vorhandenen Hefe-Enzymen von Pepsin und Papain zusammen herausgelöst wird. Diastase konnte aus der gesamten, mit siedendem Essigester getöteten Hefe kaum so viel Trockensubstanz herausholen, als vorher aus der zu 3/4 entleerten. In den gewonnenen Extrakten fand sich aber nur sehr wenig Hefegummi; noch relativ am meisten setzte Papain in Freiheit, nämlich 5% des in der frischen Hefe bestimmten Gummis. Diese Versuche beweisen die Mitwirkung überlebender Hefe-Enzyme bei der Auflösung der bei 37° mit Essigester abgetöteten Hefe. Der Vorgang

* *Vgl. R. Willstätter und W. Grasmann, Abhandlung 58.*

[2] Siehe R. WILLSTÄTTER und W. GRASSMANN, Über die Aktivierung des Papains durch Blausäure, Ztschr. physiol. Chem. **138**, 184 [1924].

der Freilegung von Invertin und von Hefegummi ist kompliziert und läßt sich nicht allein als Proteolyse oder Amylolyse auffassen.

Aus den durch den enzymatischen Abbau der Hefe gewonnenen Hefegummilösungen gelang es ohne Anwendung von Säure oder Alkali, die bei der Fällung mit Fehlingscher Lösung unvermeidlich sind, alle Verunreinigungen abzutrennen. Die niedrig molekularen Begleiter entfernten wir durch Alkohol-Fällung und Dialyse mittels Fischblasen, die wir durch eine mehrstündige Elektrodialyse vervollständigten. Dabei fiel ein Teil der Eiweißstoffe aus und wurde abfiltriert. Lösungen, die wir durch Verdauung mit Papain gewonnen hatten, bestanden nun zu etwa 60% des Trockengewichtes, die mit Diastase hergestellten zu etwa 50% aus Hefegummi. Erstere erwiesen sich als geeigneter für die Reinigung, die in der Adsorption der Verunreinigungen an Kaolin und Tonerde bestand.

Nach 6maliger Voradsorption mit kleinen Kaolinmengen (auf 7 g Trockensubstanz 60, 50, 30, 20, 12 und 8 g Kaolin in schließlich 600 ccm) zeigte die Restlösung der Papain-Verdauung eine Tonerde-Adsorptionskurve (Nr. 1 der Abbildung) mit plötzlichem, steilem Anstieg der [1646] Adsorptionswerte bei der Konzentration von 1,4 g Hefegummi im Liter oder bei der Adsorption von 30% des angewandten Hefegummis. Aus dem Verlauf dieser Kurve war zu entnehmen, daß eine Adsorption an Aluminiumhydroxyd eine starke Fraktionierung des Gemisches bringen werde, die wir 2mal mit kleinen Adsorbensmengen durchführten (je 0,025 g Al_2O_3 auf 0,5 g Trockensubstanz). In der Tat erwies sich die aus der neuen Restlösung aufgenommene Adsorptionskurve an Tonerde als die normale Isotherme (Nr. 2 der Abbildung). (Ausbeute aus 8 g in der verdauten Lösung enthaltenem 3 g reiner Hefegummi = 37,5%.)

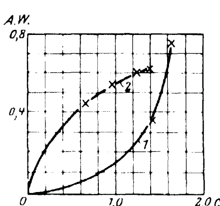


Abb.: Adsorptionskurven von Hefegummi-Präparaten aus papainverdauter Hefe an Aluminiumhydroxyd. 1. Nach Voradsorption mit Kaolin. 2. Nach Voradsorption mit Tonerde.

	angewandte Mengen g Hfg.	g Al_2O_3	Vol. ccm	adsorb. g Hfg.	A.W.	c
Kurve 1	0,100	0,078	50	0,029	0,37	1,42
	0,100	0,026	50	0,019	0,75	1,61
Kurve 2	0,077	0,104	50	0,045	0,43	0,64
	0,077	0,052	50	0,028	0,54	0,98
	0,077	0,026	50	0,015	0,60	1,23
	0,077	0,013	50	0,008	0,61	1,38

Beim Vergleich dieser Kurve mit der Adsorptions-Isotherme des gereinigten Salkowskischen Hefegummis (Kurve Nr. 2 der Abb. 1 der voranstehenden Abhandlung*) fallen die weit höheren Adsorptionswerte der letzteren auf. Man könnte daraus folgern, daß der durch enzymatischen Abbau dargestellte Hefegummi von dem Salkowskischen verschieden sei. Indessen unterscheiden sich die beiden Kurven nur durch einen konstanten Faktor; durch Multiplikation mit 2,8 fallen die niedrigeren Adsorptionswerte alle genau in den Verlauf der anderen Kurve. Nach W. MECKLENBURG[3] sind

* *Abh. 27.*

[3] Ztschr. physikal. Chem. 83, 609 [1913].

derartige affine Adsorptionskurven ein Zeichen dafür, daß die beteiligten Stoffe sich bei chemischer Identität durch ihren Dispersitätsgrad unterscheiden. Beide Kurven sind mit demselben Präparat des Ortho-aluminiumhydroxyds aufgenommen worden, allerdings mit einem Abstand von 8 Monaten. Man kann annehmen, daß in dieser Zeit die Tonerde durch Teilchenwachstum an Adsorptions-Tüchtigkeit verloren hat; wahrscheinlicher ist, daß der Hefegummi durch die beiden Methoden zwar als dasselbe chemische Individuum, aber von verschiedenem Dispersitätsgrad gewonnen wird. Die Identität der nach beiden Verfahren gewonnenen reinen Präparate beweist außerdem die Gleichheit der Drehungswinkel, die übereinstimmend zu 88,8° gefunden wurden.

Die Darstellung des Hefegummis durch enzymatischen Abbau der Hefe ergab noch ein überraschendes Resultat. Die Ausbeuten an Hefegummi in den Lösungen und die im Unverdaulichen verbliebenen Mengen betragen nämlich zusammen viel weniger, als man nach SALKOWSKIS Methode aus derselben Hefe isolieren kann. Es muß angenommen werden, daß in der [1647] Hefe ein bisher unbekanntes hefegummi-spaltendes Enzym vorhanden ist, das nach Abtötung der Hefe mit Essigester von 37° noch seine Wirksamkeit entfaltet. Zum Nachweis dieses Enzyms haben wir die Veränderungen des Hefegummi-Gehaltes durch enzymatische Vorgänge in der abgetöteten Hefe verfolgt. Daß die lebende Hefe imstande ist, beim Hungern den Hefegummi zu vermindern, ist schon von J. WARKANY[4], allerdings mit unzulänglicher Bestimmungsmethode, nachgewiesen worden. Nach einem besonderen hefegummi-spaltenden Enzym hat er aber nicht gesucht.

Man bestimmt zweckmäßig den Hefegummi-Gehalt einer Hefeprobe nach Zerstören der Struktur mit 3proz. warmer Natronlauge durch Ausfällen des Hefegummis mit Fehlingscher Lösung, Lösen in wenig Salzsäure, Fällen mit der 5fachen Menge absol. Alkohol und Polarisation des wieder aufgelösten Gummis. Die Bestimmung ist durch die optisch aktiven Verunreinigungen beeinträchtigt, gibt aber doch ein genügendes Maß des vorhandenen Gummis. Wiederholungen derselben Bestimmung differierten um weniger als 2%.

Bei zahlreichen Versuchen fanden wir in 100 g frischer Löwenbräuhefe 1,72 bis 1,74 g Hefegummi (siehe Tabelle). Tötet man die Hefe mit Essigester von 37°, so bleibt der Hefegummi-Gehalt innerhalb von 3 Tagen bei 30° unverändert. Setzten wir aber dem abzentrifugierten Niederschlag Pepsin oder Papain zu, so konnten wir nach 3 Tagen nur noch 1,38 bis 1,49 g Hefegummi nachweisen. 14 bis 20% des Hefegummis waren also verschwunden. Innerhalb von weiteren 5 Tagen änderte sich der Hefegummi-Gehalt nicht mehr merklich. Wenn man den Essigester bei Zimmertemperatur verwendet statt bei 37°, so tritt auch ohne Zusatz von Enzymen eine geringe Abnahme des Hefegummis ein (von 1,73 g auf 1,55 g).

Bewirkt man die Abtötung der Hefe durch Toluol bei Zimmer-Temperatur oder bei 37°, so beginnt sofort die Autolyse. Dabei nimmt der Hefegummi innerhalb von 3 Tagen auch ohne Zusatz von Papain oder Pepsin um 16 bis 17% ab. Zusatz von Pepsin oder Papain ist nun nicht mehr imstande, den Hefegummi-Gehalt weiter zu verringern. Die größte Abnahme beobachteten wir bei einem Versuch der totalen Auto-

[4] Biochem. Ztschr. 150, 271 [1924].

lyse ohne Zusatz eines Antisepticums. Nach 20 Tagen fanden sich nur noch 40 % des ursprünglich vorhandenen Hefegummis.

Man muß aus diesen Beobachtungen schließen, daß das hefegummi-spaltende Enzym in besonderer Weise verankert und vom Hefegummi selbst getrennt ist. Es wird durch bestimmte Vorgänge innerhalb der Autolyse oder Plasmolyse freigelegt. Darauf beruht es auch, daß wir auf keine Weise imstande waren, das Enzym aus der abgetöteten Hefe zu isolieren. Hefegummi wird weder von frischem Toluolautolysat, noch von Extrakten aus Lebedewscher Trockenhefe oder aus gefrorener Hefe hydrolysiert, auch wenn bei der Einwirkung wie bei der Extrakt-Gewinnung die Wasserstoff-Ionen-Konzentration durch Puffer-Zusatz weitgehend variiert wurde. Aus dem Versuch der totalen Autolyse ohne Zusatz eines Antisepticums kann man vielleicht schließen, daß in der noch wenig veränderten Zelle überhaupt nur ein Teil des Hefegummis (höchstens 20 %) dem Angriff des Enzyms zugänglich ist. Erst die völlige Zerstörung der Zellstruktur würde dann eine weitere Verminderung des Hefegummigehaltes ermöglichen.

Nach der Auffindung dieses Enzyms der Hefe haben wir noch einige andere Quellen kohlehydrat-spaltender Enzyme untersucht, konnten aber weder durch Taka-Diastase [1648] oder Emulsin, noch durch die Auszüge aus Aspergillus niger, Grünmalz oder Darrmalz eine Spaltung des Hefegummis bewirken.

Tabelle: Wirksamkeit der Hefe-Gummase.

Alle Bestimmungen sind mit Extrakten aus 100 g frischer Hefe nach 3tägigem Stehen bei 30° ausgeführt. 100 g frische Hefe enthalten 1,72 bis 1,74 g Hefegummi.

Hefelieferung Nr.	Vorbehandlung	noch vorhand. g Hefegummi	Abnahme in Proz.
1	Mit Toluol 1 Stde. bei 37° verflüssigt	1,46	16
	„ „ 1 „ „ 37° „	1,43	17
	„ „ bei gew. Temp. „	1,43	17
	„ Essigester 1 Stde. bei 37° verflüssigt	1,66	4
	„ „ 1 „ „ 37° „	1,63	5
	„ „ bei gew. Temp. „	1,55	10
2	„ Toluol bei gew. Temp. verflüssigt und		
	a) mit 0,2 g Pepsin versetzt	1,46	16
	b) „ 0,2 g Papain „	1,57	9
3	Mit Essigester bei gew. Temp. verflüssigt und		
	a) mit 0,4 g Pepsin versetzt	1,43	17
	b) „ 0,4 g Papain „	1,46	16
4	Mit Essigester von 37° verflüssigt und		
	a) mit 0,4 g Pepsin versetzt	1,49	14
	„ 0,4 g „ „	1,43	17
	b) „ 0,4 g Papain „	1,43	17
	„ 0,4 g „ „	1,38	20
	Totale Autolyse ohne Zusatz, nach 20 Tagen bestimmt	0,70	60

Abschnitt VII.

ÜBER MALTASE; ÜBER LACTASE; ÜBER GÄRUNG.

Zeitschrift für physiologische Chemie 110, S. 232 [1920].

61. ÜBER MALTASELÖSUNGEN AUS HEFE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER, GERTRUD OPPENHEIMER und WERNER STEIBELT.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 1 Abbildung.

(Der Redaktion zugegangen am 28. Juni 1920.)

Zur Isolierung der Maltase aus Hefe ist es nach den Angaben aller Forscher, die über das Enzym gearbeitet haben, nötig, die Hefe zuerst zu trocknen und dann mit Wasser zu behandeln. Diese Methode, Lösungen der Maltase darzustellen, ist von C. J. LINTNER[1], von E. FISCHER[2], von A. CROFT HILL[3] angegeben worden. Zwischen Saccharase und Maltase wird allgemein ein Unterschied angenommen: die Saccharase gewinnt man aus abgepreßter Bierhefe durch Ausziehen mit Wasser unter Zusatz z. B. von Toluol, die Maltase stets nach vorangegangener sorgfältiger Trocknung. Freilich ist es bekannt, daß von lebender Hefe auch Saccharase nicht abgegeben wird, aber sie diffundiert leicht aus der Zelle nach der Abtötung der Hefe durch das antiseptische Mittel. Daß unter denselben Bedingungen kein auf Maltose wirkender Auszug entsteht, wird auf die Schwerlöslichkeit der Maltase[4] oder darauf zurückgeführt, daß dieses Enzym vielleicht an Protoplasmabestandteile [233] fest gebunden vorkommt oder daß bei unversehrter Zellhülle seine Diffusion nach außen gehindert ist[1]).

Der Unterschied zwischen Saccharase und Maltase dürfte indessen darauf beruhen, daß in der Hefe nach ihrer Abtötung z. B. durch Chloroform oder Toluol durch enzymatische Vorgänge Bildung von Säure eintritt, durch welche die Maltase zerstört wird, etwa in dem Maße, wie sie in wäßrige Lösung übergeht. Jedenfalls gelingt es uns, aus frischer Bierhefe starke Maltaselösungen durch Behandlung mit Wasser unter Zusatz von Toluol bei Zimmertemperatur darzustellen, wenn man die auftretende

[1] Zeitschr. f. ges. Brauwesen 1892, S. 106; C. J. LINTNER und E. KRÖBER, Ber. d. D. chem. Ges. Bd. 28, S. 1050 [1895].

[2] Ber. d. D. chem. Ges. Bd. 27, S. 3479 [1894]; Bd. 28, S. 1429 [1895]; Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60, und zwar S. 74 [1898].

[3] Journ. Chem. Soc. Bd. 73, S. 634 [1898] und 83, 578 [1903].

[4] C. J. LINTNER, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1894, S. 414; C. J. LINTNER und E. KRÖBER, Ber. d. D. chem. Ges. Bd. 28, S. 1050, 1053 [1895].

[1]) E. FISCHER, Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60, und zwar S. 75 [1898].

Säure mit Ammoniak neutralisiert. Natürlich gibt auch getrocknete Hefe nach diesem Verfahren der Neutralextraktion mindestens ebenso wirksame Lösungen als nach den Angaben der Literatur. Diese Maltaselösungen aus Bierhefe enthalten wie alle in der Literatur auch Saccharase; die Aufgabe, beide Enzyme zu trennen, ist noch zu lösen.

Hinsichtlich der Wirksamkeit sollen die Maltaselösungen nach dem Vorbild der von C. O'SULLIVAN und F.W.V.TOMPSON[2] sowie von H.v. EULER und seinen Mitarbeitern[3] gegebenen Saccharasedefinition gekennzeichnet werden. Die Hefen und die Maltaselösungen werden durch die Zeit in Minuten bestimmt, die 1 g getrocknete Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung braucht, um bei 30° 2,5 g Maltose (Hydrat) zur Hälfte zu hydrolysieren, wenn diese mit 30 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ und 22,5 mg KH_2PO_4 in 50 ccm enthalten sind.

Proportionalität von Enzymmenge und Umsatz.

Für die Saccharasewirkung, die dem Gesetz der monomolaren Reaktion folgt, besteht auch zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit Proportionalität, die experimentell [234] von O'SULLIVAN und TOMPSON[1]), dann von C. S. HUDSON[2]) und neuerdings in einem Bereich der Enzymmengen von 1:40 von H. V. EULER und O. SVANBERG[3]) bestätigt wurde. Wie die Reaktion der Maltase nicht mit demselben Zeitgesetz in Übereinstimmung gebracht werden konnte, so war es auch fraglich, ob für sie jene Proportionalitätsbeziehung gilt. CH. PHILOCHE[4]) hat sie allerdings schon bei Takamaltase mit Enzymmengen von 1:5 bestätigt gesehen, und bei Hefemaltase haben L. MICHAELIS und P. RONA[5]) mit Fermentmengen, die im Verhältnis von 3:2:1½:1 standen, approximativ gezeigt, daß die Zeiten gleichen Umsatzes sich umgekehrt wie die Fermentmengen verhalten. Wegen der Wichtigkeit für die Analyse der Maltasepräparate wurde die Proportionalität nun mit Ausdehnung des Bereiches genauer geprüft.

Die Hydrolyse der Maltose verfolgten wir mit der polarimetrischen Methode, die uns hier genauer schien als die Bestimmung auf Grund des Reduktionsvermögens. Die Maltoselösung wurde mit wechselnden Mengen der neutralen Hefeauszüge versetzt unter Einstellung der nach L. MICHAELIS und P. RONA[6]) optimalen spurenweise saueren Reaktion ($p_H = 6,1$ bis 6,8); wir fanden dementsprechend am günstigsten einen Gehalt von einem Zehntel Phosphatmischung, die aus gleichen Teilen 0,90proz.

[2] Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834, und zwar S. 866 [1890].

[3] H. v. EULER, E. LINDBERG und K. MELANDER, Diese Zeitschr. Bd. 69, S. 152, 157 [1910]; H. v. EULER und S. KULLBERG, Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 335 [1911]; H. v. EULER und O. SVANBERG, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 [1919].

[1]) Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834, und zwar S. 847 [1890].

[2]) Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 30, S. 1564, und zwar S. 1574 [1908].

[3]) Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269, und zwar S. 275 [1919].

[4]) Journ. chim. phys. Bd. 6, S. 213, 355 [1908].

[5]) Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70, und zwar S. 78 [1913].

[6]) Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 [1913] und L. MICHAELIS, Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914 (J. Springer), S. 71.

KH_2PO_4- und 1,20proz. $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$-Lösung bestand. Die 10proz. Lösungen von wasserhaltiger Maltose wurden mit einem Gehalt von 20% dieses Puffers bei 30° im Meßkolben bereitet und die erforderlichen Proben von 25 ccm mit Enzymlösung und Wasser von derselben Temperatur aufs doppelte Volumen gebracht. Bei Beendigung der Versuche entnahmen wir 25 ccm der 30° warmen Versuchslösung und trugen sie unter Berücksichtigung der Auslaufzeit in 5 ccm 2n-Soda ein. [235] Die Anfangsdrehung der Versuchslösung nach dem Verdünnen mit jener Sodamenge betrug 10,80°, die Enddrehung bei vollkommener Spaltung würde 4,40° betragen.

Tabelle 1. Enzymkonzentration und Umsatz.
(5proz. Maltoselösung; 30°.)

Enzymmenge ccm in 50	Zeit (Minuten)	Drehungsabnahme (°)	Maltosespaltung (%)
5	120	3,03	47,3
10	60	3,03	47,3
2,5	240	2,70	42,3
10	60	2,61	40,9
2	150	2,19	34,2
5	60	2,20	34,4
10	30	2,21	34,5
2,5	180	2,24	35,0
15	30	2,14	33,5

Im Bereich von 1:5 oder 6 hat sich genaue Proportionalität von Enzymmenge und Umsatz ergeben.

Der zeitliche Verlauf.

Während nach PHILOCHE[1] bei der Maltosespaltung durch Takaenzym die Konstante der monomolaren Reaktion mit fortschreitender Zeit ansteigt, wird der entgegengesetzte Gang bei Hefemaltase in den Arbeiten von LINTNER und KRÖBER und von E. F. ARMSTRONG[2] beobachtet; auch in einer eingehenden Untersuchung von R. O. HERZOG[3] ist keine einfache Beziehung zwischen Zeit und Umsatz zutage getreten. In unseren Versuchen, die wir vornahmen, um nach dem Vorbild von O'SULLIVAN und TOMPSON jeweils beobachtete Maltosespaltungen auf den nämlichen Grad der Spaltung beziehen zu können, war der [236] Gang von k aus $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ merkwürdig verschieden. In den beiden Versuchen der Tab. 2 und der Abbildung (S. 237) fiel $10^4 k$ bis auf etwa ein Viertel, nämlich von 213 auf 46 im Bereich von 20 bis 75% Spaltung und von 213 auf 68 bei 20 bis 64% Spaltung. In zwei andern Versuchsreihen sank hingegen die Konstante nur auf etwa den halben Wert, nämlich zwischen 28 und 69% Maltosehydrolyse von 220 auf 100 und zwischen 20 und 56% Spaltung von 144 auf 69. Diese Abweichungen werden wohl durch hemmend wirkende Beimischungen bedingt sein.

[1] l. c. [2] Proc. Roy. Soc. Bd. 73, S. 500, 516, 526 [1904].
[3] In C. OPPENHEIMER, Die Fermente, IV. Aufl., Bd. II, S. 987 (Leipzig 1914).

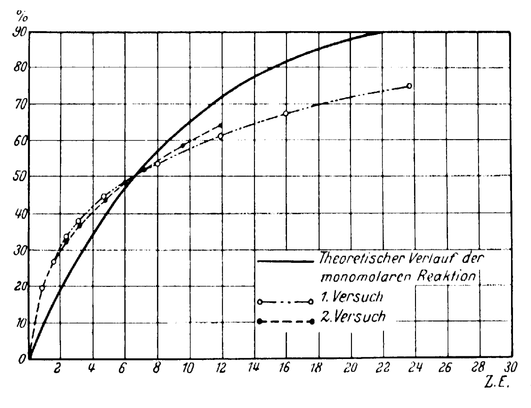
Tabelle 2. Zeitlicher Verlauf der Maltasewirkung.
(30°; 5 proz. Maltose.)

Zeit (Minuten)	1. Versuch (9 ccm Enzymlösung A in 100)		2. Versuch (10 ccm Enzymlösung B in 100)	
	Drehungsabnahme	Umsatz (%)	Drehungsabnahme	Umsatz (%)
10	1,23	19,2	1,23	19,2
20	1,72	26,9	1,72	26,9
30	2,16	33,8	2,05	32,0
40	2,41	37,7	2,35	36,8
60	2,81	44,0	2,80	43,7
80	3,13	49,0	—	—
90	—		3,34	52,2
100	3,41	53,2		—
120	—	—	3,76	58,8
150	3,92	61,2	4,09	64,0
200	4,25	66,4	—	—
300	4,78	75,0	—	—

Darstellung von Maltaselösungen.

Da bei der Herstellung von Maltaselösungen die beiden Vorgänge: Diffusion des Enzyms aus der Hefezelle und seine Zerstörung durch zugleich entstehende Säure einander entgegenwirken, so ist die Schädigung entweder durch Alkalizusatz in dem Maße der Säureproduktion oder durch ein im [237] Überschuß zugefügtes unlösliches Neutralisationsmittel zu vermeiden.

88 g gewaschene und abgepreßte untergärige Hefe der Löwenbrauerei in München wurden unter Zusatz von Toluol mit 132 ccm Wasser (entsprechend 20 g Trockenhefe + 200 ccm Wasser) angeschüttelt. Die Flüssigkeit reagierte zunächst neutral, mitunter 50 Minuten lang, manchmal ist schon nach 5 bis 6 Minuten die Reaktion deutlich sauer. Bei den verschiedenen Hefeproben sind erheblich differierende Alkalimengen erforderlich und auch etwas verschiedene Mengen je nach der Weise und Häufigkeit des Neutralisierens. Am besten ist es, häufig neutrale Reaktion auf Lackmus durch vorsichtigen Zusatz von verdünntem Ammoniak herzustellen, was bei einer Extraktionsdauer von 6 Stunden z. B.



nach	6	20	55	130	180	360	Minuten
	0,6	0,3	12,6	10,5	3,6	4,9	ccm 1 proz. Ammoniak,

also im ganzen 32,5, in einem andern Beispiel 41,8 ccm erforderte. Bei längerer Dauer der Extraktion genügte es, weiter zunächst alle 2 bis 3 Stunden, dann mit größeren Pausen die immer geringere Säureproduktion unschädlich zu machen; in den folgenden

18 Stunden waren z. B. noch 5,8 ccm erforderlich, in weiteren 2 Tagen z. B. je 1 ccm 1 proz. [238] Ammoniak. Bequemer und annähernd ebenso günstig ist es, die Flüssigkeit durch Zusatz von Magnesiumcarbonat oder dgl. konstant bei fast neutraler Reaktion zu erhalten. Dagegen entstehen viel schwächere Enzymlösungen, wenn man die Hefe unter anfänglichem Zusatz bestimmter Mengen von Alkali extrahiert, wie CROFT HILL bei Verarbeitung getrockneter Hefen vorschreibt; z. B. lieferten 88 g Hefe unter den angegebenen Bedingungen in $6^1/_2$ Stunden eine Lösung, die 16,2 % Maltosespaltung ergab, gegenüber 3,9 % Spaltung bei analoger Extraktion mit 132 ccm 0,1 proz. Natronlauge.

Die abfiltrierten Maltaselösungen, worin p_H nach der Indicatorenmethode von S. P. L. SÖRENSEN[1] = 6,6 gefunden wurde, blieben beim Stehen neutral; die Zeitwerte betrugen in den ersten Versuchen (Nr. 1 bis 4 der Tab. 3) nach 6 Stunden Extraktion 260 bis 120, nach anderthalb Tagen etwa 50 Minuten, in späteren Versuchen, nachdem das Neutralisationsverfahren ausgearbeitet war, z. B. in Nr. 5, nach eintägiger Extraktion 20 Minuten.

Tabelle 3. Zeitwerte der Maltaselösungen aus Frischhefe.

Nr.	Extraktionsdauer (Stunden)	1 proz. NH_3 f. 88 g Hefe (ccm)	Drehungsabnahme (°)	Maltosespaltung (%)	Zeitwert (Minuten)
1	$1^1/_2$	23,3	0,16	2,5	1950
	19	34,8	2,10	32,8	78
2	6	37,4	1,18	18,5	260
	30	42,6	2,49	38,0	53
3	6	41,8	1,16	18,2	260
	30	47,3	2,40	37,6	57
4	6	32,5	1,80 in 30 Minuten	28,2 in 30 Minuten	123
			2,37 in 60 Minuten	37,0 in 60 Minuten	131
	32	38,3	2,71	42,3	44
5	6	37,8	1,90	29,7	95
	24	41,8	3,82	59,7	20
	48	41,8	4,05	63,1	17
	72	41,8	4,05	63,0	17

[239] Eine solche Maltaselösung (Beispiel 5 der Tab. 3) aus einer den Zeitverhältnissen gemäß nicht besonders günstigen Frischhefe verglichen wir mit den von CROFT HILL beschriebenen besten Lösungen der Literatur aus getrockneter Hefe. Unter den analytischen Bedingungen von HILL bewirkte 1 ccm unserer Enzymlösung mit 20 ccm 2 proz. Maltose bei 30° in 40 Minuten 69,5 % Spaltung gegenüber 29 % bei CROFT HILL[1]).

Um Maltase aus getrockneter Hefe zu bereiten, ist es unnötig, die Hefe, wie HILL angegeben hat, durch stufenweises längeres Erhitzen bis auf 100° oder durch Aufbewahren im Vakuum über Schwefelsäure[2]) vorzubereiten. Lufttrockene Hefe gibt

[1] Biochem. Zeitschrift Bd. 21, S. 131 [1909].
[1]) Journ. Chem. Soc. Bd. 73, S. 634, 636 [1898].
[2]) Journ. Chem. Soc. Bd. 73, S. 634, 636 [1898] und Bd 83, S 578, 581 [1903].

dieselbe Ausbeute. 20 g Trockenhefe werden mit 200 ccm Wasser und mit Toluol angeschüttelt; die Flüssigkeit reagiert sauer, und in diesem Fall wird zur Neutralisation sofort ein bedeutender Teil der überhaupt erforderlichen Alkalimenge verbraucht, z. B. war zur neutralen Reaktion auf Lackmus hinzuzufügen:

nach	0	2	5	9	25 Stunden
	16,0	1,2	1,9	2,4	1,6 ccm 1proz. Ammoniak.

Die Maltaselösung wird am besten nach etwa eintägigem Stehen abfiltriert; die Zeitwerte einiger Darstellungen aus Trockenhefe verzeichnet die Tab. 4.

Mit derselben Hefeprobe und einer Extraktionsdauer von 2 Tagen haben wir mit 0,1proz. Natronlauge nach CROFT HILL und nach dem Neutralisationsverfahren Vergleichsversuche ausgeführt und die Wirkungswerte der verschiedenen Maltaselösungen unter den Bedingungen von HILL übereinstimmend gefunden.

Die Extrakte zeigen öfters beim Stehen, indem ein Niederschlag sich absetzt, einen kleinen Zuwachs an Wirksamkeit. Im übrigen erwiesen sich viele solche auf Lackmus neutrale toluolhaltige Lösungen tagelang fast unverändert haltbar, was

[240] Tabelle 4. Neutralauszüge von Maltase aus Trockenhefe.

Nr.	Extraktionsdauer (Stunden)	1 proz. NH_3 für 20 g Hefe (ccm)	Drehungsabnahme (°)		Maltosespaltung (%)		Zeitwert (Minuten)
			in 30 Min.	in 60 Min.	in 30 Min.	in 60 Min.	
1	18	23,6	2,41	—	37,7	—	55
	48	27,6	2,20	—	34,4	—	77
2	6	17,6	—	2,83	—	44,3	78
	22	21,2	—	3,14	—	49,0	62
	29	21,2		3,19		49,8	60
3	2	17,5	—	2,37	—	36,9	121
	5	19,4	—	3,04	—	47,5	66
	9	21,8	—	3,04		47,5	66
	25	23,4	—	2,87		44,9	77
4	1	18,6	1,61	—	25,1	—	140
	19	23,2	2,22	—	34,6	—	77
5	15	24,2	2 42	—	37,8	—	55
6	5	—	2,05	—	32,0	—	82

zahlenmäßig am Beispiel einer durch 18stündiges Extrahieren hergestellten Maltase lösung gezeigt werden soll.

7 Stunden aufbewahrt;	Drehungsabnahme	2,41°;	Maltosespaltung 37,6%.
55 ,, ,,	,,	2,31°;	,, 36,0%,
79 ,, ,,	,,	2,20°;	,, 34,5%,
103 ,, ,,	,,	2,10°;	,, 32,8%.

Die Lösungen werden von Kaolin geschwächt. Es wird also, wie L. MICHAELIS und P. RONA[1] gefunden haben, „Maltase von Kaolin sehr merklich adsorbiert", aber die Maltase scheint im Adsorbat nicht haltbar zu sein.

---

[1] Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70, und zwar S. 82 [1913].

Zeitschrift für physiologische Chemie 111, S. 157 [1920].

62. BESTIMMUNG DER MALTASE IN DER HEFE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und WERNER STEIBELT.

Zweite Mitteilung über Maltase.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 25. September 1920.)

I. Maltasewirkung frischer Hefe bei Gegenwart von Chloroform (Experiment von Morris).

Entgegen der älteren Anschauung, daß die Maltose von Hefe direkt vergoren werde, zeigten C. J. LINTNER[1] und E. FISCHER[2], daß die Hefe auch diesen Zucker zunächst durch ein Enzym spaltet, indem sie aus getrockneter Hefe wäßrige Auszüge darstellten, welche Maltose in Glucose umwandelten. Die Verschiedenheit des die Maltose spaltenden Enzyms vom Invertin sollte sich daraus ergeben, daß beim Auslaugen frischer Hefe mit Wasser (auch bei Anwendung von Betäubungsmitteln) immer nur das Enzym in Lösung geht, das den Rohrzucker spaltet. Es gelingt aber doch, wie wir vor kurzem mitgeteilt haben[3], ebenso wie Saccharase auch Maltase aus frischer Hefe auszuziehen, wenn man durch Neutralisieren der entstehenden Säure die Zerstörung des empfindlichen Enzyms verhütet. Die Maltase ist nach E. FISCHER[4] schon in der normalen Hefe enthalten, sie wird [158] nicht erst beim Trocknen gebildet. E. FISCHER[1]) hatte anfangs beobachtet, daß feuchte, unversehrte Hefe imstande sei, bei Gegenwart von Chloroform α-Methylglucosid und Maltose zu spalten. Dagegen hat G. H. MORRIS[2]) mitgeteilt, daß durch frische Hefe, sowohl Frohberghefe wie auch Brauereihefe, bei Anwesenheit von Chloroform keine Spur Traubenzucker aus Maltose erzeugt werde. E. FISCHER[3]) wiederholte darauf die Versuche bei Gegenwart anästhesierender Mittel und fand bestätigt, daß frische Hefen, Reinkulturen von Frohberg- und

[1] Zeitschr. f. ges. Brauwesen 1892, S. 106; C. J. LINTNER und E. KRÖBER, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 1050 [1895].

[2] Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 27, S. 2985 und S. 3479 [1894].

[3] R. WILLSTÄTTER, GERTR. OPPENHEIMER und W. STEIBELT, Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 232 [1920].

[4] Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 1429, 1437 [1895]; Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60, und zwar S. 75 [1898].

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 27, S. 3479 [1894].

[2]) Proc. Chem. Soc. 1895, S. 46.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 1429 [1895].

Saazhefe, in wäßriger, mit Chloroform gesättigter Lösung auf Maltose keine Wirkung ausüben. Bei Anwendung anderer anästhesierender Mittel, wie Toluol und Thymol, gelang es indessen E. FISCHER, reichliche Malzzuckerspaltung (in 40 Stunden bei 33°) zu erzielen und dadurch die Annahme zu bestätigen, daß das Enzym schon in der lebenden Hefe existiert. H. v. EULER und S. KULLBERG[4] bestätigten diese Ergebnisse und bemerkten dazu: „Immerhin wird schon durch Zusatz von Toluol die Maltosespaltung der lebenden Hefe sehr stark herabgedrückt."

Die Differenz zwischen dem Verhalten der Hefe bei Anwesenheit von Chloroform und von Toluol ist unerklärt geblieben. Es erscheint uns aber als eine Vorbedingung, um Methoden für die Bestimmung des Maltasegehaltes von Hefen zu schaffen, daß diese Verhältnisse aufgeklärt werden, von denen E. FISCHER[5] sagt: „In der Tat sind die Erscheinungen sehr verwickelt, wenn die Hefe bei Gegenwart von Chloroform mit der Maltoselösung in Berührung bleibt."

Nachdem wir erkannt hatten, daß zwischen Saccharase und Maltase in bezug auf ihre Exosmose aus frischer Hefe in Wasser kein wesentlicher Unterschied besteht, lag es nahe anzunehmen, daß die Verhältnisse bei der Maltosespaltung durch Hefe nur deshalb so kompliziert erscheinen, weil man weder der Empfindlichkeit der Maltase gegen Säuren noch [159] der Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Reaktion des Mediums genügend Rechnung getragen hat. In beiden Beziehungen lehrten die Untersuchungen von L. MICHAELIS und P. RONA[1]) „Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe" kennen. Und doch ist die Erkenntnis S. P. L. SÖRENSENS[2]) von der Wichtigkeit des Säuregrades für die enzymatischen Vorgänge nicht in ihrer vollen Tragweite diesem Gebiete zugute gekommen. Unsere Versuche liefern einen kleinen Beitrag zur Arbeit von SÖRENSEN über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei biologischen Prozessen. Dabei handelt es sich nicht um die Einstellung einer günstigen Wasserstoffzahl in der wäßrigen Zuckerlösung; das Störende ist hier die Erzeugung und die Wirkung von Säure in der Hefezelle selbst.

Der Versuch von MORRIS täuscht. Bei der Abtötung der Hefe durch Chloroform setzt die Produktion von Säure in der Hefezelle ein und schafft in dieser ein für die Spaltung der Maltose ungünstiges Milieu. Der Unterschied zwischen Chloroform und Toluol beruht einfach darauf, daß die Säurebildung der Hefe bei Gegenwart von Toluol eine langsamere ist (siehe Abschnitt III). Wird aber das Experiment mit Chloroform bei Gegenwart geeigneter Puffer ausgeführt, so erfolgt reichliche Maltosespaltung. Der Puffergehalt der Zuckerlösung, den wir für Maltaselösungen am günstigsten gefunden hatten, ergibt in diesem Fall noch keine guten Resultate. Die in der wäßrigen Lösung eingestellte Reaktion erstreckt sich nicht ohne weiteres auf den Ort der Enzymwirkung. Durch reichlicheren Zusatz des Phosphatgemisches

[4] Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 85, 92 [1911].
[5] Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 1434 [1895].
[1]) Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 [1913]; Bd. 58, S. 148 [1913].
[2]) Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 45 [1907]; Bd. 21, S. 131 [1909]; Bd. 22, S. 352 [1909]; Ergebnisse der Physiologie, herausgeg. von ASHER und SPIRO, Bd. 12, S. 393 [1912].

und noch weiter durch Anwendung einer etwas stärker alkalischen Phosphatmischung wird der Versuch so verbessert, daß die Hefe bei Gegenwart von Chloroform starke Maltosespaltung bewirkt.

Diese Ergebnisse deuten schon an, daß das Ausbleiben der Maltosespaltung unter den Versuchsbedingungen von [160] MORRIS, FISCHER, V. EULER nicht auf Zerstörung der Maltase durch die von der Hefe gebildete Säure beruht, sondern auf zu hohem Säuregrade am Reaktionsorte. Die Maltase ist viel mehr als andere Enzyme auf einen engen Bereich von Wasserstoffionenkonzentrationen angewiesen und dieser wird bei der Säureproduktion der Hefe überschritten, während das optimale [H˙]-Gebiet des Invertins nicht dadurch gestört wird. Als L. MICHAELIS und P. RONA[1] das Wirkungsoptimum der Maltase bestimmten, fanden sie, daß zu beiden Seiten desselben ein rapider Abfall der Wirkung eintritt.

Bei Gegenwart von 0,5 ccm Chloroform wurde von 2,2 g frischer Löwenbräuhefe in 100 ccm 5proz. Maltosehydratlösung bei 30°, wenn kein Puffer zugegen war, in 400 Minuten keine Maltosespaltung bewirkt (beobachtet nach Abstoppen mit $^1/_5$ Volumen 2 n-Sodalösung bei 15° α_D = 10,78°; Drehungsabnahme 0,02°).

Als die Flüssigkeit die gewöhnliche Menge Puffer, nämlich 10 ccm eines hälftigen Gemisches 1,20proz. $Na_2HPO_4 2H_2O$- und 0,90proz. KH_2PO_4-Lösung enthielt, wurden in 30 Minuten 2,0%, in 90 Minuten 8,3% Maltose gespalten (beobachtet 10,67° bzw. 10,27°; Drehungsabnahme 0,13° bzw. 0,53°).

Bei Verdoppelung dieser Puffermenge betrug die Spaltung in 30 Minuten 3,5% (beobachtet 10,58°; Drehungsabnahme 0,22°);

bei 20facher Puffermenge und Herabsetzung der Chloroformmenge auf ein Fünftel in 60 Minuten 7,8% (beobachtet 10,30°; Drehungsabnahme 0,50°). Aber bei Anwendung der 10fachen Menge Puffer und Einstellung des Mischungsverhältnisses der Phosphate auf p_H = 7,0 (6 ccm sekundäres und 4 ccm primäres Phosphat) in 30 Minuten 14,1%, in 90 Minuten 36,0% (beobachtet 9,90° bzw. 8,50°; Drehungsabnahme 0,90° bzw. 2,30°);

bei ebenfalls 10facher Puffermenge und dem Mischungsverhältnis 7 : 3 entsprechend p_H = 7,2 in 30 Minuten 23,1%, in 90 Minuten 40,6% (beobachtet 9,32° bzw. 8,20°; Drehungsabnahme 1,48° bzw. 2,60°).

II. Maltaselösungen aus frischer und aus getrockneter Hefe.

Daß die Hefe bei Gegenwart von Chloroform die Maltose nicht spaltet, weil in der Zelle zu große Säurekonzentration auftritt, wird vollends dadurch bewiesen, daß es auch ohne Neutralisation gelingt, aus Frischhefe bei Anwesenheit von Chloroform — wie übrigens auch von Toluol — Maltaselösungen herzustellen. Wäre in der Hefe gemäß dem Experiment von [161] MORRIS die Maltase vernichtet, so könnte sie natürlich nicht später im wäßrigen Auszug reichlich gefunden werden.

Die Säure wird aus der Zelle langsam an das umgebende Wasser abgegeben, in das auch Maltase übergeht. Ein solcher Auszug erwies sich zunächst als unwirksam gegen Malzzucker, auch auf Zusatz der üblichen Puffermenge.

Nach 5stündigem Extrahieren von 1 Teil Frischhefe mit 1½ Teilen Wasser bewirkten 10 ccm Extrakt in 50 ccm Versuchsflüssigkeit, enthaltend 2,5 g Maltosehydrat und normale Puffermenge, bei 30° in 30 Minuten keine Spaltung (beobachtet 10,80°, Drehungsabnahme 0°).

Dennoch liegen in solchen Auszügen Maltaselösungen vor, die aber zu sauer sind. Werden sie neutralisiert und dann mit dem Puffer versetzt, so wirken sie auf Maltose.

[1] Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 [1913].

In demselben Versuch wie oben wurde ein Teil des Extrakts nach dem Filtrieren mit Ammoniak neutralisiert. Dann ergab die Prüfung unter gleichen Umständen wie zuvor eine deutliche Drehungsabnahme (beobachtet 10,73°, Drehungsabnahme 0,07°).

In einem andern Versuch wurde nach 24stündigem Ausziehen der Hefe mit Chloroformwasser abfiltriert und mit Ammoniak neutralisiert. Dann ergab die Prüfung mit derselben Extraktmenge bei gleichem Pufferzusatz in 50 Minuten eine Spaltung von 37,5 % (beobachtet 8,40°, Abnahme 2,40°).

Allerdings enthält die Flüssigkeit nur einen Teil derjenigen Ausbeute, die unser Neutralisationsverfahren[1] unter sonst gleichen Umständen liefert.

Hefeauszug von 15 Stunden ohne Neutralisieren; nach dem Filtrieren neutralisiert; 10 ccm (entspr. 75 bis 81 g Trockenhefe) mit der gewöhnlichen Puffermenge versetzt und in 50 ccm unter Versuchsbedingungen wie oben bei 30° geprüft. In 50 Minuten betrug die Spaltung der Maltose 45,3 % (beobachtet 7,90°, Abnahme 2,90°), woraus sich gemäß unserer empirischen Kurve[2] für den Extrakt der Zeitwert 58 Minuten berechnet.

Hefeauszug von 24 Stunden unter Neutralisieren gleichzeitig aus der gleichen Hefe; 10 ccm (entspr. 100 bis 116 g Trockenhefe) ergaben in 20 Minuten 39,8° Maltosespaltung (beobachtet 8,25°, Abnahme 2,55°); Zeitwert 29 Minuten.

Der ohne Neutralisieren dargestellte Hefeauszug enthielt also 50 % von der Maltase des Neutralextraktes. Und das Verhältnis ist bei den hier gewählten Zeiten das günstigste. Nach weiteren 9 Stunden Extrahieren ohne Neutralisation ergab sich in 40 Minuten nur 37,5 % Maltosespaltung (beobachtet 8,40°, Abnahme 2,40°), daher Zeitwert 73 Minuten.

[162] Beim Ausziehen getrockneter Hefe mit Wasser ohne Neutralisieren stört die auftretende Säure viel weniger als bei frischer. Denn sie geht rasch in die wäßrige Flüssigkeit über und wird dadurch sehr verdünnt. So erklärt es sich, daß es beim Verarbeiten von Trockenhefe unwichtig ist, den entstehenden Auszug zu neutralisieren oder ihn, wie CROFT HILL[1]) vorschreibt, mit 0,1 proz. Natronlauge zu bereiten.

Zwei Auszüge wurden aus gleichen Mengen derselben Trockenhefe dargestellt, a) mit Toluolwasser, b) unter Neutralisieren; 10 ccm Extrakt a bewirkten in 30 Minuten 46,5 % Maltosespaltung (beobachtet 7,82°, Abnahme 2,98°), Zeitwert 36 Minuten. 10 ccm Extrakt b, die infolge der Volumvermehrung beim Neutralisieren nur 9,1 ccm des Auszugs a entsprachen, ergaben in 30 Minuten 48,4 % Maltosespaltung (beobachtet 7,70°, Abnahme 3,10°), Zeitwert 30 Minuten.

Vergleicht man die bei der Verarbeitung frischer und trockener Hefe auftretende Säure, so findet man nach der Indicatorenmethode von SÖRENSEN die Wasserstoffzahl nicht erheblich verschieden (beobachtet etwa 6,2) und die Säuremenge zwar bei der Frischhefe größer, aber nicht viel größer als bei Trockenhefe.

88 g frische Hefe erforderten in 24 Stunden zur Neutralisation 27,2 ccm 1 proz. Ammoniak, 20 g Trockenhefe (aus 88 g derselben frischen Hefe erhalten) erforderten 21,0 ccm 1 proz. Ammoniak.

Da beim Ausziehen trockener Hefe mit Wasser fast ebensoviel Maltase gefunden wird wie nach dem Neutralisationsverfahren, so ist nicht die in der Lösung vorhandene Säure in dem Maße der Maltase schädlich, wie man nach dem Vergleich der wäßrigen Extrakte frischer Hefe mit und ohne Neutralisieren erwarten sollte. Daher ist die Differenz zwischen den bei Gegenwart antiseptischer Mittel erhaltenen Auszügen frischer Hefe mit und ohne Neutralisieren darauf zurückzuführen, daß die in der Zelle auftretende Säure daselbst nicht allein, was im ersten Abschnitt betont wurde, hem-

[1] Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 236 [1920]. [2] Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 237 [1920].

[1]) Journ. Chem. Soc. Bd. 73, S. 634 [1898].

mend, sondern außerdem auch zerstörend wirkt. Allerdings muß erwähnt werden, daß die nicht neutralisierten Auszüge aus trockener Hefe viel haltbarer sind als die aus frischer Hefe. Sie sind reicher an Begleitstoffen, die schützend wirken.

[163] Das Neutralisationsverfahren zur Gewinnung von Maltase aus Frischhefe wird daher noch verbessert, wenn man durch Verflüssigung der Hefe mittels Chloroform beschleunigte Bildung und Abwanderung der Säure herbeiführt und dann nach Neutralisieren der entstandenen und unter zeitweiligem Neutralisieren der weiter auftretenden Säure die Maltaselösungen fertigstellt. Über die Extrakte, die mit Verflüssigung und Neutralisieren gewonnen werden, soll eine folgende Arbeit genauere Angaben mitteilen.

III. Bestimmung in frischer Hefe.

Die Wirkung der frischen Hefe auf Maltose bei Gegenwart abtötender Mittel gibt noch kein Maß für ihren Maltasegehalt. Fürs erste sind die Maltasezeitwerte, die sich für die Hefe bei verschiedenen Pufferzusätzen und bei einem bestimmten Pufferzusatz für verschiedene Versuchsdauer ergeben, nicht durchwegs konstant (s. die Tabelle). Das Optimum wird bei diesen Versuchen mit Chloroform gefunden beim Zehnfachen der in der Zeitwertdefinition vorgeschlagenen Puffermenge unter Verschiebung des Mischungsverhältnisses der Phosphate auf $p_H = 7{,}2$. Dafür sind in 50 ccm Versuchsflüssigkeit erforderlich:

420 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$

(d. i. 7,0 ccm einer 6,0proz. Lösung von $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$),

135 mg KH_2PO_4 (d. i. 3,0 ccm einer 4,5proz. Lösung von KH_2PO_4).

Die enzymatische Wirkung der Hefe ist unter diesen Umständen ferner von dem abtötenden Mittel, z. B. Chloroform oder Toluol, in merkwürdigem Maße abhängig, wie die in der folgenden Tabelle angeführten Versuche (Nr. 4, 5, 6) zeigen. Für den Vergleich sind von den Versuchen mit Toluol besonders diejenigen heranzuziehen, bei denen der dafür optimale Pufferzusatz, nämlich die Phosphatmischung der Zeitwertdefinition, aber in 10facher Menge, angewandte wurde.

Bei Gegenwart von Toluol sind die Werte der Maltosespaltung im allgemeinen niedriger als mit Chloroform. Es kommt aber vor, daß in kurzer Versuchsdauer der Zeitwert [165] der Hefe bei Anwendung von Toluol günstiger ausfällt als mit Chloroform und daß sich erst bei längerer Versuchszeit das Verhältnis umkehrt. Die Säureabgabe ist bei der Einwirkung von Chloroform auf den Hefepilz eine raschere, und es scheint dann leichter zu sein, mit Pufferzusatz nach einiger Zeit eine geeignete und gleichbleibende Wasserstoffionenkonzentration in der Zelle für die Dauer einzustellen als bei der langsamen Säureproduktion der Hefe bei Gegenwart von Toluol. Hier genügt der zu Anfang günstige Puffer bei längerer Versuchsdauer nicht mehr für die Säure am Reaktionsorte. Wenn man in dem Wasser, worin die Hefe aufgeschlämmt ist, die aus ihr herausdiffundierende Säure mit Ammoniak titriert, so findet man bei der raschen Einwirkung des Chloroforms auf die Hefe in dem umgebenden

[164] Maltasewirkung der frischen Hefe mit Chloroform und Toluol unter Anwendung von Puffern.

1,1 g Hefe auf 50 ccm Versuchsflüssigkeit; 5 proz. Maltose; 30°.

Nr.	Abtötendes Mittel (0,25 ccm auf 50 ccm Flüssigkeit)	Puffer		Versuchszeit (Minuten)	Drehungsabnahme (°)	Maltosespaltung (%)	Zeitwert (Minuten)
		ccm sekundäres Phosphat	ccm primäres Phosphat				
1	Chloroform	7	3	80	1,67	26,1	87
		9	1	80	1,35	21,1	130
2	Chloroform	6	4	30	0,80	14,1	83
				90	2,30	36,0	48
	Chloroform	7	3	30	1,48	23,1	42
				90	2,60	40,6	36
3	Chloroform	7	3	30	1,65	25,7	33
				80	2,50	39,0	36
	Chloroform	7	3	30	1,50	23,5	39
				80	2,50	39,0	36
	Chloroform	14	6	30	1,50	23,5	39
				80	2,45	38,3	37
4	Toluol	5	5	80	0,55	8,6	—
	Toluol	6	4	80	0,55	8,6	—
	Chloroform	7	3	80	1,30	20,3	140
5	Toluol	5	5	60	1,25	19,5	120
	Toluol	7	3	60	0,55	8,6	—
	Chloroform	7	3	60	1,75	27,4	59
6	Toluol	5	5	30	0,30	4,7	—
				100	0,90	14,0	280
				165	1,25	19,5	320
	Chloroform	7	3	30	0,10	1,6	—
				100	0,95	14,8	260
				165	1,75	27,3	160

Wasser frühzeitig einen großen Teil der überhaupt entstehenden Säure; die Endwerte aber sind mit Chloroform und Toluol ähnlich, sogar bei letzterem höher.

Je 55 g frische Hefe wurden mit je 500 ccm Wasser und 8 ccm Chloroform bzw. Toluol angeschüttelt. Nach 30 Minuten wiesen Proben der mit Klärerde filtrierten Lösungen, nach der Indicatorenmethode mittels Methylrot geprüft, $p_H = 6,3$ auf, zwei weitere nach 6 Stunden entnommene Proben ebenfalls übereinstimmend $p_H = 6,0$. Zur Neutralisation verbrauchten aber nach 60 Minuten je 80% der Versuchsflüssigkeit mit Chloroform 5,4 ccm, derjenigen mit Toluol nur 0,5 ccm 1 proz. Ammoniak.

In einem anderen Versuch (mit je 88 g Hefe und 132 ccm Wasser unter Zusatz von 5 ccm Chloroform bzw. Toluol) waren zur Neutralisation erforderlich bei Chloroform nach 20 Minuten bereits 11,2, nach 30 Minuten weitere 3,0, nach 45 Minuten + 4,2, nach 80 Minuten + 1,6, im ganzen 20,0 ccm 1 proz. Ammoniak. Weitere Säure wurde nicht mehr gebildet. Bei Toluol wurden nach 50 Minuten erst 1,7 ccm, nach 65 Minuten weitere 2,1, nach 80 Minuten + 1,0 ccm 1 proz. Ammoniak verbraucht, der 20. ccm aber erst am Ende der vierten Stunde. Nach 7 Stunden war die Produktion von Säure nach Verbrauch von 23,8 ccm 1 proz. Ammoniak beendet.

Das Ziel dieser Versuche mit frischer Hefe war die quantitative Bestimmung ihrer Maltasewirkung nach dem Vorbild der Saccharasebestimmung von H. VON EULER und seinen Schülern[1]. Diese Absicht wird mit der bisherigen [166] Versuchsanordnung,

[1] H. V. EULER und S. KULLBERG, Diese Zeitschr. Bd. 71, S. 14, und zwar S. 20 [1911] und Bd. 73, S. 85, und zwar S. 93 [1911]. — H. V. EULER und O. SVANBERG, Diese Zeitschr. Bd. 105, S. 187, und zwar S. 194 [1919] und Bd. 106, S. 201, und zwar S. 214 [1919].

nämlich mit der von MORRIS und von E. FISCHER, nicht erreicht auch bei Anwendung eines Puffers, der viel stärker alkalisch ist als der Wirkungsbereich der Maltase. Die Bedingungen für die enzymatische Reaktion sollten gleichmäßiger sein, das Eindringen des Puffers zur Einstellung des günstigen Milieus am Reaktionsorte verbessert werden. Eine entscheidende Verbesserung besteht darin, daß man zuerst rasche Verflüssigung der Hefe bewirkt, die Säurebildung und Säureabgabe der Hefe also auf einen kurzen Zeitraum zusammendrängt, und dann erst verdünnt, neutralisiert und den Phosphatpuffer hinzufügt. Vom Experiment E. FISCHERS, das bei Gegenwart von Toluol die Reaktion der frischen Hefe auf Malzzucker erzielte, unterscheidet sich das Verfahren, das zur quantitativen Bestimmung dieser Hefewirkung dient, in drei Punkten: rasche Verflüssigung der Hefe, Neutralisation der gebildeten Säure, Einstellung der für die Maltase günstigen Wasserstoffzahl im Sinne von SÖRENSEN und MICHAELIS.

Unter den abtötenden Mitteln ist Toluol wegen seiner zu langsamen Wirkung unanwendbar. Chloroform ist nicht das günstigste, weil das Ergebnis zu stark von seiner Menge abhängt und die optimale Menge sehr niedrig liegt, so daß leicht Differenzen vorkommen können. Am geeignetsten ist Essigester. Auch hier ist ein Einfluß der Menge auf die Maltasewirkung deutlich, aber er ist nicht so groß. Dieser Einfluß der zu großen Menge organischer Lösungsmittel besteht in einer Erschwerung des Stoffaustausches zwischen der wäßrigen Lösung und der Hefezelle, die zwar nicht mehr unversehrt ist, in der aber die Maltase noch verankert ist.

Einfluß der Chloroformmenge.

11 g Hefe wurden durch Verrühren mit 2,5 ccm Chloroform in 10 Minuten verflüssigt; nach der Neutralisation bewirkten 10% davon in 50 ccm 2,5proz. Maltosehydratlösung bei Gegenwart der in der Zeitwertdefiniton vorgeschriebenen Puffermenge bei 30° in 120 Minuten 41,4% Maltosespaltung (Drehungsabnahme 2,65°, Zeitwert 47 Minuten), jedoch unter sonst gleichen Bedingungen nur 30,5% Spaltung (Drehungsabnahme 1,95°, Zeitwert 92 Minuten), wenn während der Maltosespaltung weitere 0,5 ccm Chloroform zugegen waren.

[167] Je 11 g Hefe wurden a) mit 2,5, b) mit 5,0 und c) ebenfalls mit 5,0 ccm Chloroform verflüssigt. Nach der Neutralisation bewirkten dann je 20% der drei Aufschlämmungen, von denen a) und b) bei Gegenwart der normalen, c) aber bei Gegenwart der fünffachen Puffermenge zur Wirkung gelangten, in 100 ccm Versuchsflüssigkeit

a) in 40 Minuten 23,4%, in 110 Minuten 38,2% Maltosespaltung (Drehungsabnahme: 1,50° bzw. 2,45°, Zeitwert 54 Minuten bzw. 51 Minuten),

b) in 40 Minuten 13,3%, in 110 Minuten 23,9% Spaltung (Drehungsabnahme: 0,85° bzw. 1,53°, Zeitwert 115 Minuten bzw. 144 Minuten),

c) in 40 Minuten 17,2%, in 110 Minuten 27,8% Spaltung (Drehungsabnahme: 1,10° bzw. 1,78°, Zeitwert 89 Minuten bzw. 102 Minuten).

Alle folgenden Versuche sind ausgeführt unter Zusatz der normalen Phosphatmischung in doppelter Menge (d. h. 60 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ und 45 mg KH_2PO_4 in 50 ccm Versuchsflüssigkeit).

Je 11 g Hefe wurden a) mit 0,5, b) mit 1,0 und c) mit 2,0 ccm Chloroform verflüssigt. Je 10% der neutralisierten Hefeemulsionen bewirkten dann in 50 ccm Flüssigkeit in 50 Minuten: a) 33,2%, b) 30,9% und c) 21,8% Maltosespaltung (Drehungsabnahme: a) 2,13°, b) 1,98°, c) 1,40°; Zeitwert: a) 32 Minuten, b) 37 Minuten, c) 77 Minuten).

Einfluß der Menge von Essigester.

Nach der Verflüssigung mit 1, 2 und 3 ccm Essigester bewirkten je 10% von je 11 g Hefe in 50 ccm Versuchsflüssigkeit in 40 Minuten: 27,8%, 26,2% und 25,7% Spaltung (Drehungsabnahme: 1,78°, 1,68°, 1,65°; Zeitwert: 38 Minuten, 42 Minuten, 44 Minuten).

Bei Verwendung von 0,5, 1 und 2 ccm Essigester auf je 11 g Hefe bewirkten gleiche Hefemengen in 60 Minuten 20,0%, 32,4% und 31,3% Maltosespaltung (Drehungsabnahme: 1,28°, 2,08° und 2,00°; Zeitwert 111 Minuten, 40 Minuten und 43 Minuten) und in 95 Minuten —, 39,0% und 37,5% Spaltung (Drehungsabnahme: —, 2,50° und 2,40°; Zeitwert: —, 42 Minuten, 46 Minuten).

Vergleich der Maltasewirkung mit Chloroform und Essigester.

Zwei Proben von je 11 g der gleichen Hefe wurden mit 0,5 ccm Chloroform bzw. 1 ccm Essigester verflüssigt und neutralisiert. Je 20% dieser Mengen bewirkten in 100 ccm Versuchsflüssigkeit im Chloroformversuch in 61 Minuten 34,7%, in 114 Minuten 46,8% Spaltung (Drehungsabnahme: 2,22° bzw. 3,00°), woraus sich der Zeitwert zu 35 bzw. 33 berechnet, und im Versuch mit Essigester in 61 Minuten 35,9%, in 114 Minuten 46,8% Spaltung (Drehungsabnahme 2,30° bzw. 3,00°), Zeitwert aus beiden Beobachtungen 33.

Für zwei Proben einer anderen Hefe, die ebenfalls mit 0,5 ccm Chloroform bzw. 1 ccm Essigester verflüssigt wurden, von denen aber während der Spaltungsreaktion die doppelten Mengen wie bisher, entsprechend 4,4 g Hefe auf 100 ccm Versuchsflüssigkeit, zur Anwendung kamen, betrug die [168] Maltosespaltung nach 61 Minuten im Chloroformversuch 37,3%, im Versuch mit Essigester 36,9% (Drehungsabnahme 2,39° bzw. 2,36°; Zeitwert 60 Minuten bzw. 62 Minuten).

Aus diesen Versuchen ergibt sich für die Maltasebestimmung folgendes Verfahren:

11 g[1] Hefe werden im Becherglas mit 1 ccm Essigester versetzt und mit einem Glasstab 4 bis 6 Minuten lang verrieben, bis die Verflüssigung vollständig geworden. Darauf wird die Hefe mit 20 ccm Wasser durchgerührt und alsbald tropfenweise mit $^{n}/_{10}$ Ammoniak unter stetigem Rühren bis zur neutralen Reaktion versetzt, die man durch Tüpfeln auf hellblaues Lackmuspapier mit Vergleichsproben von destilliertem Wasser feststellt; erforderlich waren 7 bis 9 ccm. Man wartet 10 Minuten und vervollständigt, wenn es nötig ist, die Neutralisation, wozu nochmals bis 1,5 ccm $^{n}/_{10}$-Ammoniak erforderlich sein können. Die Hefesuspension wird nun in einen 50 ccm-Meßkolben übergeführt, der knapp dafür ausreicht. Zum Versuche entnehmen wir nach sorgfältigem Umschütteln mit der Pipette 20 ccm, zweckmäßig nicht mehr, die mit 5,0 g wasserhaltiger Maltose und dem Puffer[2] (120 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ + 90 mg KH_2PO_4) ohne weiteren Zusatz eines antiseptischen Mittels auf 100 ccm gebracht werden. Messungen werden in zwei Intervallen ausgeführt, und zwar so, daß eine der Beobachtungen möglichst in die Nähe von 50% Maltosespaltung führt, z. B. mit 40 und 80 Minuten Versuchszeit.

Beispiel: Hefe der Löwenbrauerei in München, 28. VII. 20. Die Maltosespaltung mit den Proben von ²/₅ aus 11 g ergab bei 30° in 60 Minuten 2,73° Drehungsabnahme entsprechend 42,6% Maltosespaltung und dem Minutenwert 43, in 86 Minuten 3,20° Drehungsabnahme entsprechend 50,0% Spaltung und dem Minutenwert 43.

Auf Grund dieser Bestimmung in der frischen Hefe wird man die Ausbeute an Maltase bei der Verarbeitung frischer [169] und trockener Hefe verfolgen. Die wenigen bisherigen Beobachtungen, die nur die Bedeutung von Beispielen haben, zeigen, daß

[1] Diese Menge, die 2,5 g Trockenhefe entspricht, ist so gewählt, daß das Ergebnis durch Division mit 2 auf die in der Zeitwertdefinition vorgeschriebene Menge (1 g) Trockenhefe zurückgeführt wird.

[2] Für die Hefe ist die Maltase-Zeitwertdefinition (Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 238) dahin abgeändert, daß die angegebene Puffermenge verdoppelt ist.

sich der größte Teil der Maltase aus der frischen Hefe gewinnen läßt. Es kommt auch vor, daß der Extrakt mehr Maltase als die Frischhefe enthält, aber darauf soll erst eingegangen werden, wenn größeres Versuchsmaterial vorliegt.

Frische Hefe der Löwenbrauerei (15. VII.) ergab den Zeitwert 33, der nach dem Neutralisationsverfahren in 24 Stunden gewonnene Auszug den Zeitwert 38 Minuten entsprechend 87% Ausbeute.

Frische Hefe der Löwenbrauerei (23. VII.) ergab den Zeitwert 63, der unter Neutralisieren in 24 Stunden bereitete Auszug den Zeitwert 54 Minuten entsprechend 117% Ausbeute.

Die Bestimmungsmethode wird ferner anzuwenden sein, um die Hefe der Brennereien und Brauereien hinsichtlich ihrer maltosespaltenden Kraft quantitativ zu prüfen, während man bisher nur ihre rohrzuckerspaltende Wirkung aus zahlreichen Angaben namentlich von EULER und seinen Mitarbeitern kannte. Um die Wirkung der Hefe auf die beiden Biosen zu vergleichen, ist es nötig, das Invertin in diesem besonderen Falle mit einem anderen Maße als dem von C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON[1] und von EULER[2] angegebenen zu messen. Anstatt die Saccharase durch die Zeit in Minuten zu definieren, die 0,05 g Präparat brauchen, um bei 15,5° 4 g Rohrzucker in 25 ccm Lösung zu 75,75% zu spalten, bestimmen wir mit der 10fachen Menge von trockener Hefe oder Präparat (0,5 g in 25 ccm) bei 30° mit einer Lösung von nur 1,1875 g Rohrzucker (entsprechend 1,25 g Maltosehydrat) die Zeit in Minuten bis zur Spaltung von 50%. Diese Angabe soll als „Vergleichszeitwert" für Saccharase bezeichnet werden. Für den Vergleich wirkt also ein und dieselbe Menge Hefe in dem nämlichen Volumen Lösung bei gleicher Temperatur auf gleiche Mengen Malzzucker und Rohrzucker ein, nur mit der [170] Besonderheit, daß für Maltase $p_H = 6{,}8$, für Saccharase $p_H = 4{,}5$ eingestellt wird. Einen solchen Vergleich haben H. v. EULER und S. KULLBERG[1]) in vorläufiger Weise angestellt und die relative Reaktionsgeschwindigkeit in 8proz. Zuckerlösung für Maltase = 1 (bis 2) und für Bierhefeinvertin = 170 angegeben.

Wir fanden mit einer Münchener Brauereihefe, daß für die Spaltung der Maltose 18mal mehr Zeit erforderlich war wie für die des Rohrzuckers. Und in einem unter Neutralisation dargestellten wäßrigen Auszug der frischen Brauereihefe betrug das Verhältnis zwischen Maltose- und Saccharosespaltung 1:30.

Beispiele: 1. Hefe der Löwenbrauerei, 13. VII. a) Maltasebestimmung. Mit 2,2 g Hefe in 100 ccm in 60 Minuten 2,40° Drehungsabnahme entsprechend 37,5% Spaltung und dem Zeitwert 29 Minuten.

b) Saccharasebestimmung. Angewandt 0,55 g Hefe mit 4,75 g Rohrzucker unter Zusatz von 2 ccm 20proz. NaH_2PO_4-Lösung in 100 ccm. Nach 30 Minuten betrug

[1] Journ. Chem. Soc. Bd. 57, S. 834, und zwar S. 866 [1890].
[2] H. v. EULER, E. LINDBERG und K. MELANDER, Diese Zeitschr. Bd. 69, S. 152, 157 [1910]; H. v. EULER und S. KULLBERG, Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 335 [1911]; H. v. EULER und O. SVANBERG, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 [1919].
[1]) Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 85, und zwar S. 96 [1911].

die Drehungsabnahme 3,76° entsprechend 54,8% Spaltung. Saccharasevergleichszeitwert 1,62 Minuten.

2. Auszug aus der Hefe der Löwenbrauerei vom 15. VII. nach dem Neutralisationsverfahren. (Volumvermehrung beim Neutralisieren 14,7%.)

a) Maltasebestimmung. Mit 20 ccm Extrakt in 100 ccm wurden in 18 Minuten 2,15° Drehungsabnahme entsprechend 33,6% Maltosespaltung gefunden. Zeitwert 39 Minuten.

b) Saccharasebestimmung. Mit 1,25 ccm Extrakt in 100 ccm wurden in 25 Minuten 3,51° Drehungsabnahme entsprechend 51,2% Rohrzuckerspaltung gefunden. Saccharasevergleichswert 1,30 Minuten.

Zeitschrift für physiologische Chemie 115, S. 211 [1921].

63. ÜBER DIE GÄRWIRKUNG MALTASEARMER HEFEN.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und WERNER STEIBELT.

Vierte Mitteilung über Maltase*.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 8 Abbildungen.

(Der Redaktion zugegangen am 3. Mai 1921.)

I. Gehalt von ober- und untergärigen Hefen an Invertin und Maltase.

Zur Verschiedenheit von Invertin und Maltase.

Als EMIL FISCHER[1] kurze Zeit nach C. J. LINTNER[2] die Hydrolyse der Maltose durch Hefeauszüge beobachtete, betrachtete er sie zunächst als eine Wirkung des Invertins. Für die Annahme eines spezifischen, auf Maltose wirkenden Enzyms entschied sich FISCHER[3] etwas später hauptsächlich auf Grund des Umstands, „daß beim Auslaugen der frischen Hefe mit Wasser . . . nur das Enzym in Lösung geht, welches den Rohrzucker spaltet". Dieses Argument für die Verschiedenheit von Invertin und Maltase ist hinfällig geworden. Es gelingt auch aus ungetrockneter Hefe, z. B. bei Anwesenheit von Chloroform oder Toluol, Maltaselösungen herzustellen[4]. Diese Auszüge sind zu stark sauer, als daß sie ohne weiteres die Maltasewirkung entfalten könnten. Aber [212] sie spalten die Maltose, wenn sie neutralisiert und mit dem geeigneten Puffer entsprechend $p_H = 6{,}8$ versetzt werden.

Auch die Verschiedenheit der optimalen Wassertsoffionenkonzentration für Invertin und Maltase, die L. MICHAELIS und P. RONA[1]) festgestellt haben, ließe sich mit

---

* *Die III. Abhandlung dieser Reihe „Über die Verschiedenheit von Maltase und α-Glucosidase" ist in den Abschnitt VIII eingereiht (Nr. 75).*

[1] Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 27, S. 2985 [1894]; Bd. 27, S. 3479 [1894] und Bd. 28, S. 1429 [1895].

[2] Zeitschr. f. ges. Brauwesen 1892, S. 106; C. J. LINTNER und E. KRÖBER, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 1050 [1895].

[3] Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 27, S. 3479 [1894].

[4] R. WILLSTÄTTER, G. OPPENHEIMER und W. STEIBELT, Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 232 [1920]; R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 157 [1920], und zwar S. 160.

[1]) Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 [1913].

der Vorstellung gut in Einklang bringen, daß ein und dasselbe Enzym unter verschiedenen Reaktionsverhältnissen die beiden Biosen angreife. Dagegen ist die ungleiche Beständigkeit von Invertin und Maltase, sei es gegen Säure[2] oder beim Fällen der Präparate mit Alkohol[3], nicht wohl vom Standpunkt ihrer Identität zu verstehen.

Die Verschiedenheit von Saccharase und Maltase wird durch das weit differierende Verhältnis, in dem die beiden Enzyme in verschiedenen Hefen auftreten, außer Zweifel gestellt. Diesen Gedanken hat schon E. FISCHER[4] in seiner zusammenfassenden Abhandlung „Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie" angedeutet, indem er von einzelnen Hefearten sprach, welche Invertin enthalten, in denen aber das maltosespaltende Enzym fehlt und umgekehrt (Saccharomyces Marxianus maltasehaltig, Schizosaccharomyces octosporus invertinhaltig[5]). Wenn es sich freilich nur um vereinzelte Hefearten handelt, ist diese Schlußfolgerung nicht einwandfrei, wie ja FISCHER auch die ganz analoge Folgerung der Verschiedenheit von Maltase und α-Glucosidase ablehnte. Es wird aber im folgenden gezeigt, daß auch in den gewöhnlichen Hefen der Gehalt an Invertin und Maltase nicht Hand in Hand geht.

Die Ausbildung spezifischer Hefeenzyme zur Hydrolyse der einzelnen zusammengesetzten Zucker kann mit verschiedenen Vorstellungen erklärt werden. Es ist möglich, daß die Saccharase, Maltase, α-Glucosidase, Lactase, Melibiase, Raffinase [213] und viele andere nebeneinander existieren und in getrennten Enzymmolekülen bestehen. Dann werden diese Enzyme sich aus derselben Grundsubstanz zusammensetzen, die ähnliche, aber nicht identische wirksame Gruppen trägt, Schlüssel mit gleichartigen Griffen und verschiedenen Bärten.

Es ist andererseits auch möglich, daß an ein und derselben Grundsubstanz, an deren Molekül die für die einzelnen Enzymreaktionen erforderlichen, von einander verschiedenen wirksamen Gruppen ausgebildet werden, mehrere von diesen auftreten, einzeln oder in größerer Zahl ausgebildet werden, einzeln oder in größerer Zahl der Zerstörung anheimfallen. Das einfachste Modell für diese Vorstellung ist ein Doppelschlüssel, aus einem Griff bestehend, der an jedem Ende einen Bart trägt. Jeder von diesen Bärten kann wachsen, verkümmern, zerstört werden; ebenso kann der Grundkörper zahlreiche Bärte tragen.

Maltasearme Brennereihefen.

In diesem Abschnitt unserer Arbeit prüfen wir die Invertin- und Maltasegehalte verschiedener Brauerei- und Brennereihefen. Eine Absicht, die wir in dieser Untersuchung verfolgen, ist die Prüfung, ob in der Praxis die Hefen ausgewählt worden sind,

[2] L. MICHAELIS und P. RONA, a. a. O.
[3] F. RÖHMANN, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 27, S. 3251 [1894].
[4] Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60 [1898], und zwar S. 73.
[5] E. FISCHER und P. LINDNER, Ber. der deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 984 [1895].

welche mit den zuckerspaltenden Enzymen ausgerüstet sind, die sie nach der herrschenden Theorie für die ihnen zukommende Aufgabe brauchen. Darauf ergibt sich die Antwort, daß unsere Brauereien mit Hefen von geeigneter enzymatischer Ausrüstung arbeiten, daß aber unsere im großen Maßstab angewandten Brennereihefen einen merkwürdigen Mangel an dem Enzym aufweisen, das für sie nach der bisherigen Anschauung unentbehrlich sein sollte. Alle, die Brauerei- und Brennereihefen, führen einen außerordentlichen Ballast von unnötigen Enzymen mit.

Um die Wirkung der Hefen auf Saccharose und auf Maltose zu vergleichen, bestimmen wir beide Reaktionen mit demselben Maße und nur mit dem Unterschiede, daß für Saccharase $p_H = 4{,}5$, für Maltase $p_H = 6{,}8$ eingestellt wird[1]. Die **[214]** Invertinwirkung wird hier also nicht mit dem von C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON und von H. v. EULER eingeführten Zeitwert[1]) gekennzeichnet, der sich auf die Hydrolyse von 25 ccm 16proz. Rohrzuckerlösung durch 0,05 g Hefe bei 15,5° bezieht, sondern sie wird unter den Bedingungen der Maltosespaltung mit dem „Vergleichszeitwert" gemessen, d. i. durch die Hydrolyse von 25 ccm 4,75proz. Rohrzuckerlösung mittels 0,5 g trockener Hefe bei 30°.

Aus mehreren Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten ergeben sich etwas differierende Zahlen der Invertin-Vergleichszeitwerte, was darauf beruhen dürfte, daß der Verlauf der Rohrzuckerinversion unter diesen Bedingungen weniger genau als bei 15,5° der von O'SULLIVAN und TOMPSON aufgestellten logarithmischen Kurve entspricht.

Die zur Analyse dienenden untergärigen Brauereihefen verdankten wir den Betrieben der Aktienbrauerei zum Löwenbräu, der Brauerei zum Spaten, der Brauerei G. Pschorr (Pschorrbräu) und des Hofbräuhauses. Außerdem zogen wir eine Reinkultur von Frohberg-Unterhefe zum Vergleich heran, die uns durch die Freundlichkeit des Herrn Privatdozenten Dr. H. LÜERS, Direktors der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München, zur Verfügung stand.

Eine Weinhefe (Aßmannshäuser) verdankten wir gleichfalls Herrn Direktor Dr. LÜERS.

Eine obergärige Weißbierhefe entstammte dem Weißbier-Bräuhaus im Tal (Schneider und Sohn).

Von den obergärigen Hefen der Brennereien haben wir zumeist die Rasse M untersucht, die gegenwärtig vom Institut für Gärungsgewerbe in Berlin N, Seestraße 13, allein vertrieben wird, und damit die Brennereiheferassen II und XII verglichen, die uns die Hefezuchtanstalt des Instituts freundlichst zur Verfügung gestellt hat. Eine dem Handel entnommene Kopenhagener Brennereihefe verdanken wir der Gefälligkeit des Herrn Prof. Dr. ALFRED JÖRGENSEN. Eine Wiener Hefe wurde als „garantiert reine Spiritus-Preßhefe" **[215]** bezogen aus der Spiritus- und Preßhefen-

[1] Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 157 [1920], und zwar S. 169.

[1]) S. die Zitate, Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 169 [1920] (*Abh. 62*).

fabrik Stadlau Wolfrum A.-G. Die obergärige Hefe der Münchner Bäckereien war „reine Branntweinhefe" der Sinner A.-G. in Karlsruhe-Grünwinkel.

In verschiedenen Brauereihefen bewegte sich der Quotient

$$\frac{\text{Zeitwert für Maltase}}{\text{Zeitwert für Invertin}}$$

in engen Grenzen und betrug ungefähr 20. Nur eine Probe der Hefe aus dem Spatenbräu, die auffallend arm an Maltase war, ergab eine bedeutende Abweichung. Allein in anderen Hefeproben desselben Betriebes war, wie sich in der voranstehenden Arbeit über Maltase und α-Glucosidase zeigte, der Maltasegehalt normal, so daß auch der Quotient dem gewöhnlichen Verhältnis entsprochen haben wird.

Die Brauereihefen wiesen einander ähnliche Zeitwerte für Invertin auf, die sich zwischen 1 und 3 bewegen. Auch den Invertingehalt mehrerer deutscher Brennereihefen fanden wir ähnlich, vielfach niedriger bei der österreichischen, weit günstiger bei der dänischen Brennereihefe, die mit dem Vergleichszeitwert 0,52 für Invertin an der Spitze aller untersuchten Hefen stand. Sie müßte ein treffliches Ausgangsmaterial für Invertindarstellung sein.

Viel bedeutender sind aber die Differenzen im Maltasegehalt (Zeitwerte 13400 bis 29) und daraus ergeben sich die größten Ausschläge für den Quotienten.

Die enzymreiche dänische Spiritushefe enthält 3 bis 5mal weniger Maltase (Zeitwert 160) als eine Münchner Brauereihefe (Zeitwert 29 bis 52). Der dänischen steht die Berliner Brennereiheferasse XII im Maltasegehalt nahe, viel ärmer an Maltase ist die Rasse II (Zeitwert 740) und wieder vielfach ärmer als diese aufgegebenen Rassen sind die Brennereihefe M, die Preßhefe von Sinner und die Stadlauer Spiritushefe.

Diese drei Hefen, von denen allerdings nur die Hefe M genau bezeichnet ist, sind entsprechend den Zeitwerten 3000 bis 13000 entweder äußerst arm an Maltase oder sogar frei von Maltase. Die Maltasewirkung ist nämlich gewiß noch zu

[216] Tabelle 1. Invertin- und Maltasewirkung verschiedener Hefen[1].

Hefe (Trockengewicht in Proz.)	Invertin			Maltase			Quotient der Zeitwerte
	Versuchszeit	Drehungsabnahme	Zeitwert	Versuchszeit	Drehungsabnahme	Zeitwert	
Löwenbräu 13. VII. 20 (22,7)	30	3,76	1,62	30	2,40	29	17,9
Löwenbräu 1. XII. 20 (22,7)	20	2,11	2,30	32	2,35	32,5	14,4
	40	3,48	2,23	65	3,20	32,5	
Hofbräu 3. XII. 20 (24,2)	20	2,21	2,33	40	2,16	52	22,7
	35	3,58	2,16	96	3,20	51	
Spatenbräu 6. XII. 20 (23,7)	20	2,84	1,69	60	1,40	195	Anfangsw. 145
	40	4,80	1,49	180	2,86	125	

[1] Die Versuche sind bei Invertin mit 0,55 g feuchter Hefe und bei Maltase mit 4,4 g feuchter Hefe in 100 ccm Flüssigkeit ausgeführt.

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Hefe (Trockengewicht in Proz.)	Invertin Versuchs-zeit	Invertin Drehungs-abnahme	Invertin Zeitwert	Maltase Versuchs-zeit	Maltase Drehungs-abnahme	Maltase Zeitwert	Quotient der Zeitwerte
Pschorrbräu 7. XII. 20 (25,2)	20 40	3,26 5,29	1,49 1,29	60	3,40	29	20,9
Frohberg-Unterhefe, Reinkultur 4. II. 21 (23,6)	30	3,32	2,04	90	2,92	58	28,5
Weißbräu Tal 13. XII. 20 (24,0)	21 30	1,71 2,42	3,30 3,15	40 80	1,95 2,65	65 66	20,4
Weinhefe Aßmannsh. 4. II. 21 [217] (27,0)	30	3,56	2,08	90 160	1,43 2,09	320 250	Anfangsw. 194
Brennereihefe M 23. XII. 20 (24,3)	40	2,10	4,96	160	0,25	3 500	> 700
Brennereihefe M 12. I. 21 (24,5)	22 30	1,66 2,71	3,66 3,61	450	1,00	2600	> 700
Brennereihefe M 26. I. 21 (22,2)	39	3,21	2,60	210	0,08	13400	> 5000
Brennereihefe M 7. III. 21 (22,8)	—	—	—	340 1740	0,25 1,08	8 100 8 100	—
Brennereihefe Rasse II 12. II. 21 (34,2)	25 60	1,86 3,80	5,05 4,89	150	1,34	740	150
Brennereihefe Rasse XII 26. II. 21 (25,0)	27	4,44	1,22	100 150	1,71 2,48	230 150	Anfangsw. 290
Spiritushefe Stadlau 25. II. 21 (30,3)	55	1,54	12,2	100 400	0,14 0,24	4400 12400	400 bis 1000
Branntweinhefe Sinner 3. III. 21 (28,0)	45	3,51	3,34	103	0,24	3000	> 900
Brennereihefe Kopenhagen 21. II. 21 (21,6)	14	4,58	0,52	77 204	1,65 2,62	160 160	320

[218] hoch gefunden worden. In den üblichen Bestimmungszeiten war gar keine Maltasewirkung zu beobachten. Daher mußten die Beobachtungen auf viel größere Zeiten, als der Bestimmungsmethode entspricht, ausgedehnt werden. Auch dann fiel der Umsatz noch in den allerersten Teil der Reaktionskurve und schritt nicht weiter. Und in eben diesen Hefen erwies sich das Zymasesystem derart widerstandsfähig, daß auch durch den bei der Bestimmung üblichen Zusatz von Essigester die Gärung nicht ausgeschaltet

werden konnte. Es empfiehlt sich, in solchen Fällen die Essigestermenge zu verdoppeln, auf 2 ccm für 11 g Hefe. Dann wird die Gärung wenigstens so weit unterdrückt, daß keine sichtbare Kohlensäureentwicklung mehr erfolgt.

Die in diesen Fällen angegebenen geringfügigen Maltasewirkungen sind also mindestens zum Teil nur scheinbare, von der Maltosegärung vorgetäuscht. Übrigens ist es für die in den nächsten Abschnitten gezogenen Schlußfolgerungen ohne Belang, ob diese maltosevergärenden Hefen frei oder fast frei von Maltase sind.

II. Geschwindigkeit der Vergärung von Maltose.

Die Literatur über Gärung ist zu arm an quantitativen Angaben, die den Verlauf der Vergärung verschiedener Zucker durch verschiedene Hefen vergleichen. Die vorliegenden quantitativen Beobachtungen betreffen teils, wie viele der wichtigen Messungen von A. SLATOR[1], die Anfangsgeschwindigkeit der Gärung, teils den Betrag der im ganzen entwickelten Kohlensäure, vielfach auch die willkürlich definierte Triebkraft und Gärkraft, aber zu wenig den zeitlichen Verlauf der Gärung der einzelnen Zucker, der zur Kennzeichnung der Hefen geeignet wäre. Von verhältnismäßig untergeordneter Bedeutung ist es dabei, welchen analytischen Weg man zur Kohlensäurebestimmung wählt, ob Wägung, Volummessung, maßanalytische Bestimmung, Druckmessung, interferometrische oder kalorimetrische Messung.

Die öfters angewandte Beobachtung im SCHRÖTTER- oder [219]EINHORN-Saccharometer ist ungenau und kann irreführen. Z. B. zeigte die Brennereihefe M (12. Jan.) ohne oder mit Nährlösung in 5proz. Maltoselösung in 24 Stunden keine CO_2-Entwicklung. Eine andere Probe (26. Jan.) gab ohne Nährlösung in 20 Stunden 0 ccm CO_2, mit Nährlösung in 7 Stunden 0,2 ccm, während in derselben Zeit aus Saccharose 4,2 ccm entbunden wurden. Bei der quantitativen Bestimmung wird sich im folgenden ein ganz anderes Bild für das Gärvermögen dieser Hefen ergeben. Einer der Fehler bei der Beobachtung im Gärröhrchen, aber nicht nur in diesem, besteht in der Anwendung von Zuckerlösungen, die nicht zuvor mit Kohlensäure gesättigt sind. Der Beginn einer Gärung entzieht sich dadurch der Beobachtung. Und bei sehr schwacher Gärung kann infolge der Diffusion von Kohlensäure aus der Lösung im offenen Schenkel sogar der ganze Verlauf unmerkbar werden.

Um die Hefe durch quantitative Angaben über ihr Gärvermögen zu kennzeichnen, sind zum Vergleich geeignete Bedingungen aufzustellen. Für den in dieser Arbeit begonnenen Vergleich zwischen Spaltungsvermögen und Gärvermögen der Hefen gegenüber verschiedenen Zuckern ist es von Nutzen, aus den Ergebnissen eines Gärversuches eine Zahl hervorzuheben, die dem „Zeitwert" der Hefe für Saccharase und Maltase analog ist und die als „Halbgärzeit" bezeichnet werden soll. Halbgärzeit für eine bestimmte Temperatur ist die Zeit, in der durch Vergärung unter gewissen Bedingungen die Hälfte der theoretisch möglichen Kohlensäuremenge entbunden wird. Die Halbgärzeit ist also durch die entwickelte Kohlensäure bestimmt,

[1] Journ. Chem. Soc. Bd. 89, S. 128 [1906] und Bd. 93, S. 217 [1908].

nicht durch den verbrauchten Zucker. Die Menge des letzteren beträgt mehr als 50%. Bei vielen Versuchen, in denen die Restlösungen nach Auffangen von 50% Kohlensäure untersucht wurden, war in ihnen merklich weniger als 50% des Zuckers vorhanden.

Die Bedingungen der Gärung sind: 20 ccm 5proz. Lösung von Glucose, von Maltosehydrat u. a., oder 4,75proz. von Rohrzucker; die 0,2 g trockener Hefe[1] entsprechende Menge [220] frischer Hefe; Sättigung der Lösung mit Kohlensäure bei der Versuchstemperatur; Anwendung von Nährstoffen; konstante Temperatur; gelindes Schütteln des Gärgefäßes.

Die Halbgärmenge der Kohlensäure beträgt bei Zimmertemperatur (20°) und 720 mm Druck: 144 ccm[1]).

Um die Zeiten der halben Hydrolyse und der halben Vergärung zu vergleichen, braucht man nur den Zeitwert der Hefe, z. B. für Maltase, der sich auf 1 g trockene Hefe in 50 ccm 5proz. Maltoselösung bezieht, mit 2 zu multiplizieren, was erlaubt ist, da die Zeiten gleicher Maltosespaltung sich umgekehrt wie die Fermentmengen verhalten.

Als Nährstoffe verwenden wir auf 0,2 g wasserfreier Hefe:

0,25 g KH_2PO_4
0,2 g Acetamid oder 0,25 g Pepton
0,025 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ und
0,01 g $CaSO_4 \cdot 2\,H_2O$.

Für gewisse Vergleiche wird man dafür Sorge tragen müssen, daß die Hefen auch unter vergleichbaren Bedingungen zur Untersuchung angewandt werden, soweit als möglich in ähnlichem physiologischem Zustand, nämlich nach gleicher Vorbehandlung, Ernährung, Lagerung. Die Vermehrung der Hefe im Gärversuch, die manchmal zu berücksichtigen sein wird, konnte bei den nachfolgenden Versuchen außer Betracht bleiben.

Das ständige, gelinde Schütteln des Gärkölbchens führten wir erst im Laufe unserer Versuche ein, es fehlte in den ersten nachstehenden Gärproben. Wenn man es unterläßt, wird die Gärgeschwindigkeit, wenigstens bei rascher Gärung, durch den Diffusionsvorgang limitiert, indem die Verarmung an Kohlehydrat in der die Hefe umgebenden Schicht, namentlich wenn sich die Hefe durch Absitzen von der Lösung absperrt, eine Verzögerung der Gärung bewirkt.

Als Beispiel sei die Vergärung von Maltose bei 30° durch Bierhefe ohne und mit Schütteln angeführt. Im ersten Fall betrug die Halbgärzeit 112, im zweiten 80 Minuten. Bei [221] Gärversuchen mit Schütteln wird, wie Abb. 1 zeigt, die Beziehung zwischen Zeit und Gärung annähernd durch eine Gerade ausgedrückt bis zur Entbindung von 80% der Kohlensäure, dann tritt scharfe Verlangsamung ein.

[1] Einige der ersten Versuche sind mit der halben Hefemenge ausgeführt.
[1]) Auf diese Bedingungen beziehen sich alle folgenden Volumenangaben.

Stunden	1/2	1	1 1/2	2	3	17
Ohne Schütteln ccm	30	75	119	151	195	247 (= 86%)
Mit Schütteln ccm	53	111	160	204	239	246 (= 86%).

Das Schütteln bewirken wir mit einem Exzenter, den eine Wasserturbine oder ein kleiner Motor bewegt[1].

Die Kohlensäurebestimmung führen wir volumetrisch aus, indem wir aus kleinen Gasometern Quecksilber[2] verdrängen und in Meßzylinder abfließen lassen.

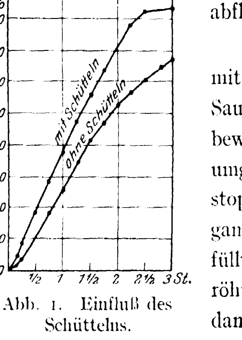


Abb. 1. Einfluß des Schüttelns.

Der Gasometer (Abb. 2) besteht in einer umgedrehten, mit einem Gummistopfen durch Drahtligatur verschlossenen Saugflasche A. Sie ist durch einen Druckschlauch mit dem beweglichen Glasrohr B verbunden, von dem ein nach unten umgebogenes Ablaufrohr abgezweigt ist. Durch den Gummistopfen ist das mit einem Glashahn versehene Rohr C bis ganz oben in den möglichst vollständig mit Quecksilber gefüllten Gasometer eingeführt. Das obere Ende der Glasröhre muß zur Seite, links in der Abbildung, gebogen sein, damit, wenn einmal Quecksilber hineingelangt, dieses durch Neigen des Apparates durch den Hahn abgelassen werden kann. Der Apparat wird durch B mit Quecksilber gefüllt; er wird, während der Hahnstopfen entfernt ist, mit dem Gärkolben verbunden. Der Druck ändert sich beim Auffangen der Kohlensäure [222] beträchtliche Zeit nur wenig, später wird er durch Neigen des beweglichen Rohres B ausgeglichen.

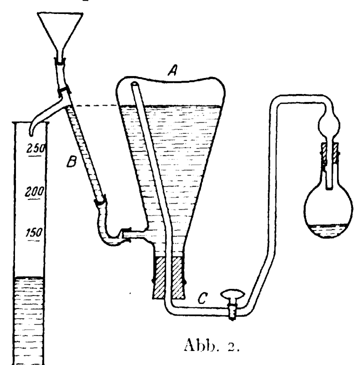


Abb. 2.

Die Brennereihefen M und II bei 18°.

Brennereihefe M (26. I. 21), 0,1 g trocken, mit Saccharose und Maltose, 18°, ohne Schütteln.

Im Maltoseversuch traten in den ersten 5 Stunden nur Spuren CO_2 auf, die Halbgärzeit betrug 33 Stunden, doppelt soviel als für Saccharose.

Vergleich der Anfangsstadien (siehe Abb. 3).

Minuten	80	300	450	575	710	850	1000
Saccharose . .	2	25	50	70	93	112	145 ccm
Maltose	—	—	1	4	8	16	30 ccm

[1] Ähnlich wie bei Hydrierungen mit Platinmohr, siehe z. B. R. WILLSTÄTTER und E. SONNENFELD, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 46, S. 2952, und zwar S. 2955 [1913].

[2] Auffangen über Wasser mit einer Schicht von Erdöl (M. HAYDUCK, Prüfung der Preßhefe auf Gärkraft, Zeitschr. f. Spiritusindustrie 1882, S. 226) ist nicht genau genug, da beide Flüssigkeiten Kohlensäure absorbieren.

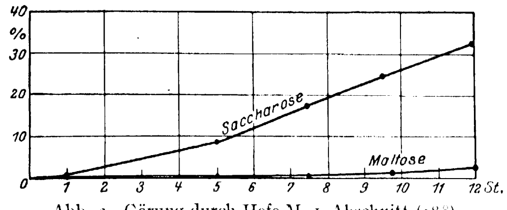


Abb. 3. Gärung durch Hefe M, 1. Abschnitt (18°).

[223] Maltosegärung bis zum Halbwert (Abb. 4).

Stunden	$7^1/_2$	12	14	25	28	33
ccm	<1	8	16	74	98	**143**

Die angewandte Hefe hätte nach ihrem scheinbaren Maltasezeitwert (13400) bei 30° in 33 Stunden nur 6% Maltose hydrolysiert, während in derselben Zeit unter den ungünstigeren Bedingungen bei 18° 50% vergoren wurden.

Brennereihefe II (12. II. 21), 0,2 g trocken, mit Saccharose und Maltose, 18°, ohne Schütteln.

Die Wirkung auf Rohrzucker ist ähnlich, das Verhalten gegen Maltose ein anderes als bei M. Die Gärung setzt viel rascher ein, der Halbgärzeitwert ist aber nicht viel günstiger, da die Gärkurve gleichmäßiger ansteigt (Abb. 5).

Minuten	145	240	335	420	590	975
Saccharose	17	38	73	108	**145**	205 ccm
Maltose	4	9	23	45	83	**144** ccm

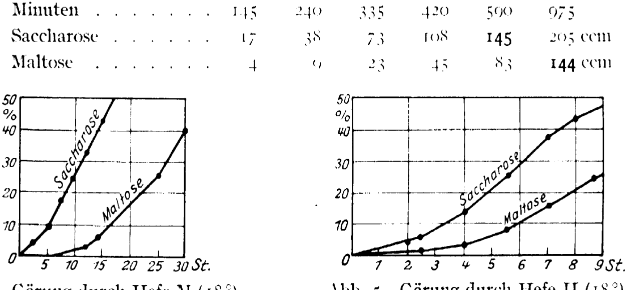


Abb. 4. Gärung durch Hefe M (18°). Abb. 5. Gärung durch Hefe II (18°).

Die Hefe II ist zwar maltasearm, aber sicher maltasehaltig. Ihr Maltasezeitwert (740) konnte zuverlässig bestimmt werden; die Gärung hat dabei keine Rolle gespielt und die Hydrolyse ist nicht wie bei den maltaseärmsten Hefen stehen geblieben.

Die Hälfte der Maltose wäre bei 30° und optimalem p_H in $24^1/_2$ Stunden hydrolysiert worden, während bei 18° ihre Vergärung 16 Stunden erforderte.

[224] Brauereihefe und Brennereihefen, bei 30°.

Hefe M (26. I.), 0,1 g trocken, mit Saccharose und Maltose, 30°, ohne Schütteln (Abb. 6).

Minuten	30	90	160	270	380	450	600	780
Saccharose	3	22	54	104	**148**	161	183	220 ccm
Maltose	<1	<2	3	16	39	58	98	**143** ccm

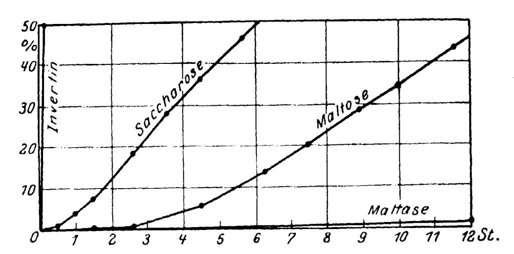


Abb. 6. Hydrolyse und Gärung von Saccharose und Maltose durch Hefe M (30°).

Unter gleichen Bedingungen erfordert die Hydrolyse von 50% Rohrzucker 10 Minuten, die Vergärung 6 Stunden, die Hydrolyse von 50% Maltose 900 Stunden, die Vergärung 13 Stunden.

Hefe II (12. II.), 0,2 g trocken, mit Saccharose und Maltose, 30°, ohne Schütteln (Abb. 7).

Minuten	30	60	90	120	150	180	360	615
Saccharose	3,5	15	29	44	58	77	**150**	222 ccm
Maltose	1	6,5	14	25	36	46	94	**142** ccm

Für den Rohrzucker ist das Verhältnis zwischen Hydrolysen- und Gärzeit dasselbe wie im letzten Beispiel; für 50% der Maltose würde die Hydrolyse 2$^1/_2$mal soviel Zeit erfordern als diese Vergärung. Während die Hefen M und II bei 18° den Rohrzucker gleich rasch vergären, wirkt bei 30° die Rasse II langsamer, der Temperaturkoeffizient der Gärung ist hier ungünstiger, daher erfordert die Vergärung von 50% Rohrzucker durch die doppelte Menge Hefe II dieselbe Zeit wie durch M. **[225]** Bei der Maltose ist in Anbetracht des langsamen Gärungsanfangs nicht zu erwarten, daß die doppelte Hefe in der halben Zeit vergärt. In der Tat ist die Maltosevergärung durch Hefe II bei 30° im Vergleich zur Wirkung bei 18° und zu der von M ungünstig.

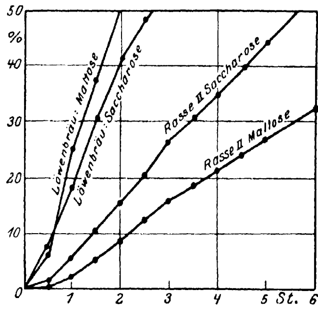


Abb. 7. Vergleich der Gärung durch Brennereihefe II und Bierhefe.

Aus diesen Gärversuchen, in denen die Bedingungen noch nicht die günstigsten und nicht wie im folgenden Abschnitt gleichmäßig waren, sollen keine weitgehenden Schlüsse gezogen werden; die Beispiele dürften aber schon die Verschiedenheit der Hefen bei der Vergärung der beiden Zucker kennzeichnen. Die Hefe II erscheint als verhältnismäßig ungünstig für Gärung in der Wärme.

Löwenbräuhefe (18. II.), 0,2 g trocken, 30°, ohne Schütteln (Abb. 7).

Minuten	30	60	90	120	150	180	270	24 Stunden
Saccharose	22	54	88	118	139	**156**	200	260 ccm (= 90%)
Maltose	19	70	108	**142**	167	187	224	258 ccm (= 90%)

Die Maltose wird durch die Bierhefe rascher vergoren als Rohrzucker, dieser doppelt so rasch als durch Rasse II. Unter gleichen Bedingungen erfordert die Hydrolyse von 50% Saccharose ungefähr 5 Minuten, die Vergärung 2½ Stunden; **[226]** die Hydrolyse der halben Maltose 1 Stunde, die Vergärung ohne Schütteln 2 Stunden, mit Schütteln 80 Minuten.

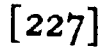
Brauereihefe und Brennereihefen bei 30° unter Schütteln.

Unter den endgiltigen Bedingungen der Halbgärbestimmung wurde die Maltosegärung durch Brauereihefe und durch die uns zugänglichen Brennereihefen verglichen, also durch Hefen von hohem, niedrigem und spurenweisem Maltasegehalt (Tabelle 2 und Abb. 8). Die Halbgärzeiten liegen weit auseinander. Die Löwenbräuhefe erforderte 80 Minuten, die Brennereihefen 3fache bis 15fache Zeit. Wenn von der Bierhefe der Malzzucker zur Hefe vergoren ist, hat die Gärung bei den die Maltase entbehrenden Hefen noch nicht begonnen. Wenn die Bierhefe über 80% vergoren hat, erreicht die Gärung bei der Preßhefe von Sinner 2%, bei der österreichischen Spiritushefe 1%. Wenn die Rasse XII 80 ccm Kohlensäure entwickelt hat, ist aus der Gärung mit Hefe M erst 1 ccm entbunden.

Tabelle 2.
Bestimmung der Halbgärzeiten von Bier- und Brennereihefen für Maltose bei 30°.

Stunden	Löwenbrauhefe ccm	Brennerei hefe XII ccm	Dänische Brennereihefe ccm	Brennereihefe M 7. III. ccm	Sinnerhefe ccm	Wiener Hefe ccm
½	53	13	15		—	—
1	111	35	27	—	—	—
2	204	80	61	1	1	> 1
3	238	129	97	28	6	3
4		169	132	51	11	8
6		215	196	97	33	18

Die folgende Zusammenstellung vergleicht die Zeiten der halben Gärung und der halben Hydrolyse. Bei den maltasehaltigen, aber maltasearmen Hefen (Rasse XII und dänische Hefe) kommen die Halbgärzeiten den Zeiten der halben Hydrolyse nahe.


[227]

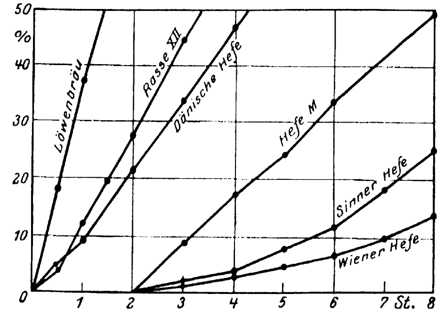


Abb. 8. Bestimmung der Halbgärzeit für Maltose bei 30°.

	Löwenbräuhefe	Brennereihefe XII	Dänische Brennereihefe	Brennereihefe M	Wiener Hefe
Halbe Hydrolyse	60	Anfangsw. 760 Endw. 300	320	16000	25000 Minuten
Halbe Gärung	80	204	254	486	1200 Minuten

III. Direkte und indirekte Maltosegärung.

Für Maltose und andere Polysaccharide außer Rohrzucker nahm man früher direkte Vergärbarkeit an. Die Untersuchungen von E. FISCHER und P. LINDNER[1] haben indessen zu der Anschauung[2] geführt, „daß jeder Mikroorganismus, welcher ein Polysaccharid zu vergären vermag, auch ein die Spaltung dieses Polysaccharids auslösendes Enzym enthält, und daß die Vergärung immer erst indirekt — d. h. nach primär erfolgter Zerlegung in gärfähige Monosaccharide — erfolgt". Diese [228] Annahme wird als bewiesen betrachtet[1]). Für die Maltose spricht sie E. F. ARMSTRONG[2]) folgendermaßen aus: „Maltose is fermented only by those yeasts which contain maltase, and then not until inversion has been brought about by the enzyme."

Aus den oben stehenden Beobachtungen ergibt sich, daß die Maltase auch ohne vorangehende Hydrolyse vergärbar ist. Ebenso läßt sich, wie in einer demnächst zu veröffentlichenden Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und GERTRUD OPPENHEIMER gefunden wurde, Milchzucker direkt vergären.

Bei der Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Maltosegärung begegnen wir dreierlei Fällen. Durch Münchner Brauereihefe wird die Maltose rascher oder gleich rasch wie Rohrzucker vergoren, die 50proz. Hydrolyse der Maltose verläuft hier etwas rascher als die Gärung. Die maltasearmen, aber sicher maltasehaltigen Brennereihefen, die Hefen II und XII des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe und die dänische Hefe, bewirken hingegen Halbgärung der Maltose etwas rascher als die halbe Hydrolyse. Die praktisch maltasefreien Brennereihefen endlich, nämlich die Berliner Hefe M und zwei dem Handel entnommene, vergären die Maltose in Zeiten, in denen die Hydrolyse gar keine Rolle spielt.

Durch diesen Vergleich der Gär- und Hydrolysengeschwindigkeit wird bewiesen, daß gewisse Hefen, und zwar für die Vergärung der Maltose im großen Maßstab angewandte, die Maltose ausschließlich direkt vergären.

Während bei den praktisch maltasefreien Hefen die Vergärung auffallend langsam einsetzt, ist bei den Brennereihefen mit niedrigem Maltasegehalt der Gärbeginn rasch und der zeitliche Verlauf gleichmäßiger. Die Beobachtungen sprechen dafür, daß hier die Spaltung des Zuckers durch die Maltase, [229] also die indirekte Gärung,

[1] Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 984 u. 3034 [1895]; E. FISCHER, Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60 [1898], und zwar S. 72.

[2] V. MEYER und P. JACOBSON, Lehrbuch der organischen Chemie, 2. Auflage, Bd. I, 2. Teil [1913], S. 1001.

[1]) Auch quantitative Beobachtungen an maltasearmen Hefen ließen sich bisher damit in Einklang bringen, vgl. A. SLATOR (a. a. O.) und besonders H. EULER und G. LUNDEQUIST, Diese Zeitschr. Bd. 72, S. 97 [1911].

[2]) The simple Carbohydrates and the Glucosides, 3. Ed., London 1919, S. 102.

der direkten zu Hilfe kommt. Direkte Gärung ist auch bei diesen Hefen nach dem Verhältnis der Geschwindigkeiten von Spaltung und Gärung anzunehmen.

Selbst bei der maltasereichsten, Maltose sehr rasch vergärenden Bierhefe, läßt die Geschwindigkeitsmessung darauf schließen, daß direkte Vergärung der Maltose neben der indirekten erfolgt. Während nämlich bei dem halben Umsatz die Hydrolyse noch der Gärung etwas vorauseilt, kehrt sich dieses Verhältnis bei weiterem Fortgang der Gärung bald um. Die Gärgeschwindigkeit wird bis über 80% Vergärung annähernd durch eine Gerade ausgedrückt, die Kurve der Hydrolyse fällt aber stark ab. Die Gärung wird also nicht durch die Hydrolyse limitiert.

	Hydrolyse	Gärung
50%	60	80 Min.
80%	250	140 Min.

Voraussetzung dieser Betrachtungen ist die Zuverlässigkeit unserer Maltasebestimmung. Während Invertin nach einem großen Beobachtungsmaterial sicher bestimmt werden kann, ist die Maltasebestimmung dadurch rückständig geblieben, daß die Bildung von Säure beim Abtöten der Hefe und die geeignete Wasserstoffionenkonzentration nicht berücksichtigt wurde. Nach dem analytischen Verfahren, das auf der raschen Verflüssigung der Hefe durch Essigester, Neutralisation der entstehenden Säure und Einstellung der für die Maltase optimalen Wasserstoffzahl beruht, wird die Bestimmung der Maltase mit der nämlichen Sicherheit und Genauigkeit ausführbar, wie die des Invertins.

Ob nicht bei den maltasearmen Hefen vielleicht doch in der Maltasebestimmung eine Unsicherheit enthalten ist, prüfen wir durch Untersuchung der Hefe nach Vergärung der Maltose, ferner durch Maltasebestimmung in getrockneten Hefen und in ihren Auszügen.

[230] Die maltasearmen Hefen könnten eine Vorstufe, ein Zymogen der Maltase, enthalten und daraus im Laufe der Gärung Maltase bilden. Allein auch am Ende der Gärung war der Maltasegehalt nicht größer.

Die Hefe M (12. I.) bewirkte unter den Bedingungen der Maltasebestimmung (0,5 g Hefe [Trockengewicht], 50 ccm) in 450 Minuten Drehungsabnahme von 1,00° entsprechend 15,6% Spaltung und einem Zeitwert von 2600. Nachdem 2 g feuchte Hefe 5 g Maltose in 24 Stunden zu über 90% vergoren hatten, wurde die Hefe abgesaugt, gewaschen und in der üblichen Weise wieder bestimmt. Nun betrug die Drehungsabnahme (0,45 g trockene Hefe, 50 ccm) in 100 Minuten 0,20° entsprechend 3,1% Spaltung und einem Zeitwert von 3300.

Die Stadlauer Preßhefe (25. II.) bewirkte (0,6 g trockene Hefe, 50 ccm) in 400 Minuten eine Drehungsabnahme von 0,24°, entsprechend 3,9% Spaltung und einem Zeitwert von 12400. Wir ließen durch 0,88 g feuchte Hefe 1 g Maltose in 21 Stunden zu 73% vergären und wiederholten mit der zurückgewonnenen Hefe die Maltasebestimmung. In 170 Minuten betrug die Drehungsabnahme (0,24 g, 50 ccm) 0,06°, entsprechend 1% Spaltung und einem Zeitwert von 10000.

In lufttrockenem Zustand prüften wir die Hefe M (vom 26. I.), deren Zeitwert 13400 betrug. Die feingemahlene Hefe rief bei Gegenwart von Toluol in 15 Stunden und 20 Minuten (1 g, 50 ccm) Drehungsabnahme von 1,52° hervor, entsprechend einer scheinbaren Spaltung von 23,7% und einem Zeitwert von auch nur 7000, der aber durch Gärung vorgetäuscht war. Denn die Bestimmung mit Fehlingscher Lösung bewies, daß kein Zuwachs an reduzierendem Zucker eingetreten, sondern daß ungefähr 19% Maltose vergoren waren, während sich aus der Drehungsabnahme bei der Maltasebestimmung ein Verlust von 14% Maltose berechnen würde.

Aus dieser Trockenhefe gewannen wir nach dem Neutralisationsverfahren einen Auszug; zwei Maltasebestimmungen ergaben in 46 Stunden 1,00 und in 38 Stunden 0,94° Drehungsabnahme entsprechend 15,6 und 14,7% Spaltung und Zeitwerten von 13800 und 12100. In den beiden Fällen bestätigte die Zuckerbestimmung (gef. durch Reduktion 16 und 15% Spaltung), daß wirklich Maltosespaltung, nicht wieder nur Vergärung eingetreten war.

Bei der Maltosegärung durch die Maltase entbehrenden Hefen ist weder unter der Voraussetzung, daß indirekte noch daß direkte Vergärung erfolgte, das Auftreten von Glucose in der gärenden Lösung zu erwarten. In der Tat ist auch keine Glucose in den Restlösungen bei unterbrochener Gärung aufgefunden worden. Es hat sich gezeigt, daß viel [231] Gärungszwischenprodukt darin vorkommt, dessen Natur mit der Hefe und den Gärbedingungen zu variieren scheint.

Bei einer Gärung mit der österr. Preßhefe wurden 73% der theoretischen Kohlensäuremenge aufgefangen. Dann enthielt die Restlösung anstatt etwas mehr als 20% der Maltose nach der polarimetrischen Bestimmung nur noch 3,2, nach der Bestimmung mit Kupferlösung 4,9% Maltose. Die letztere Zahl ist wohl durch reduzierend wirkendes Zwischenprodukt erhöht. Berechnete man die polarimetrische und die Reduktionsbestimmung auf Glucose, so würde sich 7,8% (polarimetrisch) und 2,6% (durch Reduktion) ergeben, viel zu weit differierende Werte.

Bei einer Maltasebestimmung mit dieser Wiener Hefe trat trotz der Anwesenheit von Essigester deutliche Gärung ein. Nach der polarimetrischen Bestimmung waren nach 17 Stunden noch 49% der Maltose übrig, nach der Analyse mit Fehlingscher Lösung nur 42%.

Bei einer unterbrochenen Gärung mit der Hefe M war dagegen das Reduktionsvermögen der Gärungsrestlösung erheblich größer als der polarimetrische Wert. Nach Auffangen von 44% des theoretischen Kohlendioxyds entsprach das Drehungsvermögen der Restlösung einem Gehalt von nur 39,4 (statt über 50)% Maltose. Würde man den Restzucker nach dem Drehungsvermögen als Glucose berechnen, so käme man zu 97% des zur Gärung angewandten Malzzuckers in Form von Glucose. Die Analyse der Restlösung mit Fehlingschem Reagens stimmte für einen Gehalt von 50% Maltose; der zu hohe Wert dürfte durch reduzierend wirkendes Gärungszwischenprodukt zu erklären sein.

IV. Zur enzymatischen Eigenart der Hefen.

Die maltasefreien oder praktisch maltasefreien Hefe, mit denen wir uns befaßten, haben in den Brennereien große Bedeutung erlangt. Wenn man ihren enzymatischen Wert analysiert, ist es schwer begreiflich, welchen Umständen sie die angenommene Überlegenheit verdanken mögen.

Die Brennereihefe M des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe wird in Märcker-Delbrücks Handbuch der Spiritusfabrikation[1] neben den Rassen II und XII zu den besten Zuchten gezählt. Sie wird als eine sog. „Mischhefe" bezeichnet, „d. h. als Aussaat für ihre Gewinnung im großen dient in der Hefenzuchtanstalt ein Gemisch von 5 im Laboratorium in Reinkultur gezüchteten Heferassen, von denen jede bei näherem Studium wertvolle Eigenschaften gezeigt hat".

[232] Nach G. ELLRODT[1]) ist die Hefe M eine von W. HENNEBERG aus 5 Rassen zusammengestellte Mischung, worin Rasse II, die von P. LINDNER aus der Betriebshefe der Brennerei zu Gronowo rein gezüchtet wurde, und Rasse XII, die MATTHES rein gezüchtet hat, enthalten sind.

[1] 9. Auflage, Berlin 1908, S. 578.

[1]) „Spiritusfabrikation" in R. O. HERZOG, Chem. Technologie der organischen Verbindungen, Heidelberg 1912, S. 312.

Die wesentliche Verschiedenheit der Hefe M im Maltasegehalt gegenüber den Rassen II und XII ist mit dieser Angabe schwer in Einklang zu bringen. Es scheint, daß die Rassen II und XII in der Mischung unterdrückt worden sind.

In W. HENNEBERGS „Gärungsbakteriologisches Praktikum"[2] ist nur angegeben, daß die Hefe M aus 5 verschiedenen, sehr gärkräftigen Rassen bestehe, ohne daß die Komponenten genannt werden.

Der Vergleich der untergärigen Bierhefe, z. B. aus dem Löwenbräu in München, mit den untersuchten obergärigen spricht nicht zugunsten der ausgewählten Brennereihefen, deren enzymatischer Apparat zu ärmlich erscheint. In bezug auf Gärwirkung und Vollständigkeit der Vergärung auch bei Gegenwart von Alkohol ist die Bierhefe jenen Oberhefen überlegen.

Wir verglichen den Einfluß eines Gehalts von 10 Vol.-% Alkohol auf die Vergärung von Maltose durch Löwenbräuhefe und durch die Heferasse II. Die Gärwirkung der Brennereihefe war viel stärker gehemmt.

Löwenbräuhefe (0,88 g feucht = 0,2 g trocken) mit Nährstoffen; 20 ccm 5 proz. Maltose, enthaltend 2 ccm Alkohol. 30°.

Stunden	ohne Alkohol ccm	mit Alkohol ccm
1 1/4	90	18
18 2/3	240	126
40		132

[233] Brennereihefe II (0,88 g feucht = 0,3 g trocken) mit Nährstoffen; 20 ccm 5proz. Maltose, enthaltend 2 ccm Alkohol. 30°.

Stunden	ohne Alkohol ccm	mit Alkohol ccm
1 1/4	18	1
18 2/3	225	22
40		32

Für die Systematik der Hefen hat schon E. CHR. HANSEN[1]) nachdrücklich das Verhalten gegen die verschiedenen Zuckerarten herangezogen, also den Gehalt des Pilzes an bestimmten zuckerspaltenden Enzymen. Als systematisches Prinzip schien dieser Gesichtspunkt ungeeignet zu sein, als DUBOURG[2]) angab, daß invertinfreie Hefe beim Gewöhnen an Rohrzucker Invertin bilde, und daß Galaktose nicht vergärende Hefe durch Anpassung zum Vergären dieses Zuckers gebracht werden könne. Indessen hat eine sorgfältige Nachprüfung von A. KLÖCKNER[3]) diese von DUCLAUX[4])

[2] Berlin 1909, S. 413.

[1]) „Über das Verhalten der Alkoholgärungspilze zu den Zuckerarten", Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, Bd. 2, Heft 5, S. 220 [1888] und Gesammelte theoretische Abhandlungen über Gärungsorganismen von E. CHR. HANSEN, Jena 1911, S. 226.

[2]) Compt. rend. Bd. 128, S. 440 [1899].

[3]) Compt. rend. d. Trav. du Laboratoire de Carlsberg, Bd. V, S. 58 [1903]; über Gewöhnung an Galaktose siehe P. LINDNER in H. EULER und P. LINDNER, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung, Leipzig 1915, S. 29, und besonders das Kapitel „Hervorrufung einer latenten Enzymwirkung" in H. v. EULER, Chemie der Enzyme, 2. Auflage, 1920, S. 293.

[4]) Traité de microbiologie, Bd. III [1900].

betonten Angaben über Gewöhnung an Rohrzucker widerlegt und bestätigt, daß die Bildung bestimmter zuckerspaltender Fermente eines der beständigen Artmerkmale darstellt.

Der Gehalt an gewissen nicht allgemein verbreiteten Enzymen dürfte charakteristischer und vermutlich konstanter sein als die Eigentümlichkeit, ober- oder untergärig aufzutreten.

Damit die Pilzarten und Rassen durch ihren Gehalt an zuckerspaltenden und zuckervergärenden Enzymen erfolgreicher und vollkommener als bisher charakterisiert werden können, [234] ist es notwendig und anzustreben, die Analyse der Enzyme, vor allem ihre quantitative Bestimmung im Pilze selbst weiter auszubilden.

Die Zahl der Polysaccharid hydrolysierenden Enzyme ist, wie die voranstehenden Abhandlungen ergeben haben, größer als man annahm. Ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist es, daß auch die Anzahl der Zymasen beträchtlich größer ist als man annahm, da zusammengesetzte Zucker ohne vorangehende Hydrolyse durch die Wirkung ganz spezifischer Zymasen vergoren werden. Da es maltasefreie Saccharomycesarten gibt, die Maltose nicht vergären können (wie Saccharomyces Marxianus HANSEN, und S. exiguus HANSEN), und solche, die doch Maltose vergären, so ist der Unterschied im Fehlen oder Vorhandensein der spezifischen Maltose-zymase zu suchen.

Zeitschrift für physiologische Chemie 118, S. 168 [1922].

64. ÜBER LACTASEGEHALT UND GÄRVERMÖGEN VON MILCHZUCKERHEFEN.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und GERTRUD OPPENHEIMER.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 4. Oktober 1921.)

Um Enzympräparate aus Hefe genauer zu beurteilen, ist es nötig, die quantitative Analyse der kohlehydratspaltenden Enzyme zu vervollständigen. Wird diese Analyse, wie es für Saccharase seit langem gelungen ist, in jedem einzelnen Fall noch einen Schritt weitergeführt, nämlich die Bestimmung der enzymatischen Leistungen im Pilz selbst ausgeführt, dann ist die Möglichkeit vorbereitet, die Arten und Rassen der Hefen vollkommener als bisher durch ihren Gehalt an zuckerspaltenden und vergärenden Enzymen zu kennzeichnen. Für die einzelnen enzymatischen Komponenten des eigentlichen Zymasesystems ist man freilich noch sehr weit von diesem Ziel entfernt. Die enzymatische Einrichtung der Hefe für Gärung läßt sich vorläufig nur als ein Ganzes durch die Messung des Gärverlaufes beobachten. Aber auch dieser kleine Teil der für die Zymase zu lösenden analytischen Aufgabe wird zur Charakterisierung der Hefen viel beitragen.

Eine Studie über die quantitativen Beziehungen zwischen kohlehydratspaltenden und vergärenden Enzymen hat vor kurzem zu dem Ergebnis geführt[1], daß gewisse Hefen, die in großem Maßstab für die Malzzuckervergärung angewandt werden, wenig [169] oder keine Maltase und reichlich Maltose unmittelbar vergärende Zymase enthalten. Die vorliegende Untersuchung behandelt nun die Frage, ob analog auch der Milchzucker von gewissen Hefen direkt vergoren wird.

Über die Kinetik der Hefelactase war noch zu wenig bekannt. Das Enzym wirkt optimal in neutralem Medium. Der zeitliche Verlauf der Milchzuckerspaltung weicht vom Gesetz der monomolekularen Reaktion stark ab und entspricht ganz der Maltose- und α-Glucosidhydrolyse durch die Hefenenzyme. Die Kefirlactase ist von der Emulsinlactase verschieden. Dies wurde schon von H. E. ARMSTRONG, E. F. ARMSTRONG und

[1] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 211 [1921] (*Abh. 63*).

E. HORTON[1] wahrscheinlich gemacht durch den Nachweis, daß Kefirlactase durch Galaktose, Mandellactase durch Glucose gehemmt wird. Der Vergleich beider Lactasen hinsichtlich der Reaktionskinetik bestätigt ihre Verschiedenheit; denn in einer vor kurzem in dieser Zeitschrift veröffentlichten Arbeit* von R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI „Zur Kenntnis des Emulsins" ist die Mandellactase durch die optimale Wasserstoffzahl 4,2 bis 4,6 und durch den genau monomolekularen Verlauf ihrer hydrolytischen Wirkung gekennzeichnet worden.

In zahlreichen Kulturen dreier Milchzuckerhefen haben wir die Lactasewirkung quantitativ bestimmt. Sie differiert gemäß den Lactasezeitwerten 3000 bis 7 in sehr weiten Grenzen, ähnlich wie die Maltasezeitwerte von Brennereihefen. Überraschend finden wir die bei anderen Hefen noch nicht beobachteten großen Schwankungen bei annähernd gleichartig und fast zu gleicher Zeit gezüchteten Kulturen derselben Milchzuckerhefe; eher erklärlich sind die Differenzen, die beim Verändern der Nahrung auftreten. Auch das Gärvermögen für Lactose, Glucose und Galaktose ist auffallend ungleich. Die Milchzuckergärung durch Hefe von bekanntem Lactasewert weist keine Parallele, überhaupt gar keine Beziehung auf zwischen dem Gehalt der Hefe an kohlehydratspaltendem Enzym und an Zymasen.

Es ist kaum zu bezweifeln, daß in manchen Fällen der [170] Gärung von Milchzucker seine Spaltung vorangeht. Aber gewisser ist es, daß der Milchzucker ohne Spaltung vergoren werden kann. Es kommt vor, daß Lactose rascher gärt als das entsprechende Gemisch von Glucose und Galaktose, und es kommt vor, daß die Lactosegärung viel rascher verläuft als ihre Hydrolyse durch die nämliche Hefe unter optimalen Verhältnissen. Unterbricht man die Lactosegärung an einem früheren oder späteren Punkt, so trifft man in der Zuckerrestlösung keine Monose an, auch nicht im Versuch mit lactasereicher Hefe, während es ein leichtes ist, bei der Gärung des Rohrzuckers schon bald seine beiden Komponenten in der Zuckerlösung zu finden.

Bestimmungsmethode.

Die Wirkung der Lactase soll entsprechend derjenigen von Maltase und α-Methylglucosidase durch den Zeitwert in Minuten gemessen werden, welche 1 g trockene Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung brauchen würde, um bei 30° und optimalem p_H in 50 ccm Lösung 2,5 g Lactose (Hydrat) zu hydrolysieren. Als günstige Wasserstoffzahl wird mit Vorbehalt ungefähr 7 angenommen. Sie wird mit 10 ccm Phosphatpuffer nach SÖRENSEN im Verhältnis von 3,8 prim.: 6,2 sek. Salz eingestellt. Es schien zweckmäßig zu sein, eine große Puffermenge anzuwenden, z. B. $^1/_3$-molares Phosphat, d. i. 360 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 175 mg KH_2PO_4.

Für alle Versuche diente wasserhaltiger Milchzucker von $[\alpha]_D = +52{,}53°$[1]). Seine Reinheit wurde durch jodometrische Bestimmung nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL bestätigt, die wie für Glucose auch für Lactose und Maltose anwendbar ist.

[1] Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 80, S. 321 [1908]. * Abh. 77.

[1]) Übereinstimmend mit E. v. LIPPMANN, Die Chemie der Zuckerarten, 3. Aufl., S. 1528.

0,1500 g Lactose erforderten 8,31 ccm $^n/_{10}$-Jod; gef. 0,1496 g.
0,0750 g „ „ 4,16 ccm $^n/_{10}$-Jod; gef. 0,0749 g.

Da die jodometrische Analyse durch die stickstoffhaltigen Verbindungen in den Lactaselösungen unanwendbar gemacht wird und die polarimetrische Bestimmung geringe Ausschläge gibt, analysieren wir die Gemische von Lactose und ihren [171] Komponenten in allen Fällen mit der Kupfermethode unter den Bedingungen von BERTRAND[1]. Unter den Verhältnissen der enzymatischen Lactosespaltung ermittelten wir Kupferwerte von 10 zu 10% Spaltung, indem wir 5proz. Lösungen der Lactose (wasserhaltig) und der äquimolekularen Gemische von Glucose und Galaktose in den verschiedenen Verhältnissen aus Büretten in 25-ccm-Kolben einfließen ließen, woraus nach Erwärmen auf 30° 5 ccm entnommen und auf 100 ccm aufgefüllt wurden. Zur Bestimmung dienten 20 ccm. Der Bestimmungsfehler überschreitet nicht ±0,05 ccm Permanganat, aber dieser Differenz entspricht schon ein Unterschied von ±2,5% Lactosespaltung.

Tabelle 1. Kupferzahlen der Gemische von Lactose und Glucose + Galaktose.

Lactose ccm	Glucose + Galaktose ccm	Perm. (0,169 n) ccm	Kupfer mg	Kupfermittelwert mg
1,0	0	6,10; 6,15	62,1; 62,6	62,35
0,9	0,1	6,30; 6,35	64,1; 64,6	64,35
0,8	0,2	6,60; 6,65	67,2; 67,7	67,45
0,7	0,3	6,90; 6,90	70,2; 70,2	70,2
0,6	0,4	7,15; 7,15	72,8; 72,8	72,8
0,5	0,5	7,45; 7,50	75,8; 76,3	76,15
0,4	0,6	7,65; 7,70	77,9; 78,4	78,15
0,3	0,7	8,09; 8,09	82,3; 82,3	82,3
0,2	0,8	8,38; 8,38	85,3; 85,3	85,3
0	1,0	9,00; 9,00	91,6; 91,6	91,6

Die Versuche mit Lactase wurden demgemäß so angesetzt, daß wir die 10proz. Lösungen von Lactose (25 ccm) mit 10 ccm $^1/_3$mol. Phosphatmischung, mit Enzym und Wasser auf 50 ccm brachten und die Reaktion bei 30° stattfinden ließen. Proben von 5 ccm wurden entnommen und zum [172] Abbrechen der Enzymreaktion in mit 5 ccm 2n-Soda beschickte Meßkolben eingetragen, um ein Fünftel zur Kupferbestimmung anzuwenden. Der Sodazusatz ist ohne Einfluß auf die Permanganatmengen.

Das p_H-Optimum prüften wir bisher nur mit verflüssigter Hefe, noch nicht mit Lactaselösungen, da die schwierig wachsenden Kulturen uns nur in geringen Mengen zur Verfügung standen und da sie oft enzymarm waren. Die Hefen wurden unter den Bedingungen der Maltasebestimmung von WILLSTÄTTER und STEIBELT angewandt, nämlich mit abtötenden Lösungsmitteln verrieben, worauf man die entstandene Säure vorsichtig mit 1proz. Ammoniak neutralisierte. Eine Unsicherheit in diesen Ver-

[1] BERTRAND und THOMAS, Guide de chimie biolog., II. Aufl., S. 85 [1913]; ABDERHALDEN, Handb. d. biochem. Arbeitsmeth., I. Aufl., II. Bd., S. 181.

suchen bestand darin, daß die Hefen und zwar besonders die lactasearmen große Widerstandsfähigkeit hinsichtlich ihres Gärvermögens zeigten. Es kam öfters vor, daß auch nach der Verflüssigung durch das Zellgift die Gärwirkung auf Milchzucker noch bedeutend und anhaltend war. Damit hängt vielleicht auch die scheinbar ungleiche Geschwindigkeit der Lactosespaltung bei Anwendung verschiedener abtötender Mittel zusammen.

Vergleich neutraler und spurenweise saurer Reaktion. 1,5 g S. fragilis von 25% Trockengehalt wurden mit Chloroform verflüssigt. Bei $p_H = 6{,}5$ betrug in 6 Stunden die Spaltung (75,9 mg Cu) 49%, entsprechend dem Zeitwert 68, bei $p_H = 7$ erreichte sie denselben Grad (75,9 mg Cu) in 5 Stunden gemäß dem Zeitwert 52.

Neutrale und spurenweise alkalische Reaktion. Eine andere Kultur (1 g, 25% Trockengewicht) derselben Hefe und zwar unsere lactasereichste von S. fragilis wurde teils mit Chloroform, teils mit Essigester verflüssigt.

$p_H = 7$. Versuch mit Chloroform.
Nach 2 Stunden 75,3 mg Cu, entsprechend 47% Spaltung und Zeitwert 17.

Versuch mit Essigester.
Nach 2 Stunden 71,4 mg Cu, entsprechend 35% Spaltung und Zeitwert 26.

$p_H = 7{,}3$. Versuch mit Chloroform.
Nach 2 Stunden 74,3 mg Cu, entsprechend 44% Spaltung und Zeitwert 20.

Versuch mit Essigester.
Nach 2 Stunden 70,4 mg Cu, entsprechend 31% Spaltung und Zeitwert 38.

[173] Hiernach scheint neutrale Reaktion etwas günstiger zu sein als schwach saure und als spurenweise alkalische.

Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge ist in den von E. F. Armstrong[1] veröffentlichten Versuchen nicht erreicht worden. Wir fanden gleichfalls bei Versuchen mit wenig Lactase und sehr langer Dauer zu geringen Umsatz, offenbar deshalb, weil das empfindliche Enzym verdarb. Indessen fanden wir im engeren Bereich (1:2) genau bestätigt, daß die Zeiten gleichen Umsatzes sich umgekehrt wie die Enzymmengen verhalten[2]. Dafür war die Lactaselösung aus S. fragilis durch Verflüssigung, Neutralisieren und Verreiben mit Sand dargestellt; 5 ccm (Zeitwert 520) entsprechen 0,23 g trockener Hefe.

5 ccm Enzym bewirkten in 4 Stunden in 50 ccm 14% Spaltung; gef. 65,4 mg Cu.
10 ccm Enzym bewirkten in 2 Stunden in 50 ccm 14% Spaltung; gef. 65,4 mg Cu.

In ihrem zeitlichen Verlauf entspricht die Lactasewirkung weitgehend den vor kurzem untersuchten[3] Reaktionen der Hefemaltase und α-Methylglucosidase. Diese drei in neutralem und spurenweise saurem Gebiet optimal verlaufenden Hydrolysen zeigen einen vom Gesetz der monomolekularen Reaktion stark abweichenden Verlauf.

[1] Proc. Roy. Soc. Bd. 73, S. 500 [1904].
[2] Bei der Bestimmung der Lactasezeitwerte waren wir öfters genötigt, mit zu kleinen Hefemengen zu arbeiten und die Berechnung unter Voraussetzung einer in weiteren Grenzen geltenden Proportionalität auszuführen.
[3] Diese Zs. Bd. 110, S. 232 [1920] und Bd. 115, S. 199 [1921] (*Abh. 61 und 76*).

Die Geschwindigkeitskonstante fällt[4] mit fortschreitender Reaktion regelmäßig und bedeutend ab. Die Tab. 2 stellt einen Versuch dar mit Lactoselösung vom Zeitwert 75 aus S. fragilis, einer Kultur vom Zeitwert 60; [174] die Lactose wurde in ihrer 5proz. Lösung während 9 Stunden zu 87% gespalten. Dieses Beispiel liegt der Reaktionskurve (Abb. 1) zugrunde, mittels deren aus den beobachteten Milchzuckerspaltungen die Zeiten der 50proz. Hydrolyse abgeleitet wurden.

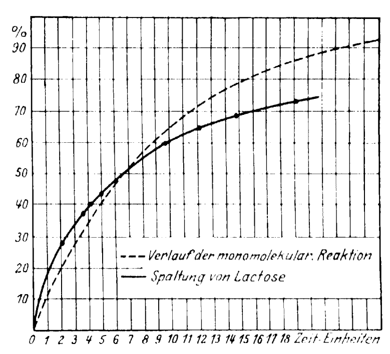


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der Lactosespaltung.

Tabelle 2. Zeitlicher Verlauf der Lactosespaltung. (30°, p_H = 7; 5proz. Lactose; Lactase dargestellt aus 0,8 g S. fragilis.)

Zeit Minuten	Cu mg	Spaltung %	$\frac{10^5}{t} \lg \frac{a}{a-x}$
0	62,4	0	
30	69,4	28	476
52	71,9	37	386
60	72,6	40	370
70	73,9	43	349
80	75,2	47	345
90	75,8	49	325
110	77,1	55	315
135	78,8	62	311
172	80,3	65	265
210	81,8	69	243
270	83,3	73,5	214
390	85,8	84	204
550	87,3	87,5	182

[175]

Lactasegehalte der Hefen.

Lactase hat zuerst M. W. BEIJERINCK[1]) in Kefir- und in Käsehefe nachzuweisen versucht, aber seine Beweisführung hat keine Anerkennung gefunden. Seine beiden Hefen, Saccharomyces Kefir und S. Tyrocola werden übrigens von A. JÖRGENSEN[2]) zu den Nichtsaccharomyceten gezählt, wie man auch die schon früher beschriebenen Milchzuckerhefen von E. DUCLEAUX[3]) und von L. ADAMETZ[4]) als Torulaarten auffaßt.

[4] Zu diesem Ergebnis ist schon 1906 H. P. BARENDRECHT (Zs. phys. Chem. Bd. 54, S. 367 [1906]) hinsichtlich der Kinetik von Kefirlactase gekommen; unsere Reaktionsbedingungen sind den seinigen ähnlich, nur ist bei BARENDRECHT die angewandte Hefemenge nicht bestimmt.

[1]) Zbl. f. Bakteriologie und Parasitenkunde Bd. 6, S. 44 [1889].

[2]) Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. 5. Aufl., Berlin 1909, S. 406.

[3]) Ann. Inst. Pasteur Bd. 1, S. 573 [1887] und Bd. 3, S. 201 [1889].

[4]) Zbl. f. Bakt. u. Parasitenk. Bd. 5, S. 116 [1889].

Den Nachweis von Lactase hat zuerst EMIL FISCHER[5] mittels der Osazonmethode erbracht. Er stellte aus Kefirkörnern, am besten nach späteren Angaben aus frisch von der Molkerei bezogenen und gewaschenen, durch zweitägige Einwirkung von Toluolwasser bei 20 bis 23° eine Enzymlösung dar, die bei 30 bis 35° in 20 Stunden eine reichliche Menge Milchzucker spaltete. Diesen Versuch wiederholte FISCHER, wobei aber nur ziemlich schwache Wirkung zu beobachten war, mit dem wäßrigen Auszug einer aus der Berliner Versuchs- und Lehrbrauerei stammenden reinen Milchzuckerhefe, die zuvor lufttrocken mit Glaspulver sorgfältig zerrieben werden mußte. Viel wirksamer war bei Gegenwart von Chloroform die Milchzuckerhefe selbst. Die Autolyse der Hefe hat also nur geringe Lactaseausbeute geliefert. Weitere Anhaltspunkte über Ausbeuten an gelöster Lactase und Angaben über Lactasegehalte von Hefen scheint die Literatur nicht aufzuweisen.

[176] Kefir in frischem Zustand war für uns unzugänglich. Kefirkörner des Handels erwiesen sich als verdorben. Aus dem Orient bezogen wir ein besseres Material, dessen Alter aber auch zweifelhaft war. Diese Kefirkörner bewirkten wohl Milchzuckergärung, aber sie lieferten uns, nach den Angaben der Literatur mit Wasser bei Gegenwart von Toluol behandelt, in mehreren Versuchen gar keine Lactase in Lösung.

Für unsere Lactasebestimmungen kamen daher nur frische Reinkulturen von Milchzuckerhefen in Betracht. Für die meisten Versuche diente der im Laboratorium von A. JÖRGENSEN entdeckte, zu den echten Saccharomyceten zählende S. fragilis JÖRGENSEN[1]) und zwar eine Reinkultur, die von Herrn Dr. F. OEHLKERS, Assistent des gärungsphysiologischen Laboratoriums der Akademie für Landwirtschaft in Weihenstephan, aus dem Laboratorium von Prof. JÖRGENSEN in Kopenhagen bezogen und in Hefewasser mit Lactosezusatz weiter gezüchtet war. Von Herrn Dr. OEHLKERS, dem wir für seine freundliche Unterstützung zu Dank verpflichtet sind, erhielten wir von Zeit zu Zeit Reinkulturen des Pilzes, auf Watte geimpft, die wir mit wiederholt sterilisiertem und filtriertem Hefedekokt unter Zusatz von 7 bis 10% Lactose bei 26° weiterzüchteten. In günstigen Fällen betrug die Ausbeute in 14 Tagen in 3 Kolben von etwa 3 l Inhalt zusammen 8 bis 20 g. Sie war manchmal etwas besser, wenn statt der Hefeabkochung sterilisierte Bierwürze unter Zusatz von Milchzucker angewandt wurde, aber die so gezogene Hefe scheint ärmer an Lactase zu sein.

Ferner untersuchten wir zwei Milchzuckerhefen, die das Berliner Institut für Gärungsgewerbe zur Verfügung stellte, bezeichnet Sp. 60a und Sp. 102. Aus den Agarkulturen wurde die Hefe in der wissenschaftlichen Station für Brauerei weitergezüchtet, deren Direktor, Herr Prof. Dr. LÜERS, uns in dankenswerter Weise untersützt hat.

[5] Chem. Ber. Bd. 27, S. 2985 [1894] und Bd. 27, S. 3479 [1894]; E. FISCHER und E. F. ARMSTRONG, Chem. Ber. Bd. 35, S. 3144 [1902]; E. FISCHER und G. ZEMPLÉN, Ann. d. Chem. Bd. 372, S. 254 [1910]. Die besten Angaben für Kefirlactase sind in der letzten Arbeit veröffentlicht. Eine etwas abweichende Vorschrift zu ihrer Darstellung gibt E. F. ARMSTRONG, Proc. Roy. Soc. Bd. 73, S. 500 [1904]. Ferner finden sich bemerkenswerte Angaben über Züchtung von Kefirhefe in Molken und Darstellung einer Lactaselösung bei H. P. BARENDRECHT, Zs. physik. Chem. Bd. 54, S. 367 [1906].

[1]) A. JÖRGENSEN, Die Mikroorganismen in der Gärungsindustrie, S. 377.

Als Kulturflüssigkeit diente teils anorganische Nährlösung mit Zusatz von Pepton [177] und Zucker, teils kalt bereiteter Malzauszug oder, anscheinend am günstigsten, eine Mischung beider mit Zusatz von 10% Milchzucker. Die beiden Hefen wuchsen sehr langsam, im besten Fall betrug die Ausbeute in 2 Wochen 2,5 bis 3 g.

In frischer Hefe läßt sich Saccharase ganz ebenso wie in wäßriger Lösung quantitativ bestimmen, dabei bedingt es keinen erheblichen Unterschied, ob man mit Zellgiften die Gärung ausschließt oder nicht, sie macht sich in der kurzen Zeit und bei der niederen Temperatur der Bestimmung nicht störend bemerkbar. Dagegen läßt sich Lactase ebenso wenig wie Maltase ohne besondere Maßnahmen in frischer Hefe oder in abgetöteter bestimmen. Die Methode der Maltasebestimmung in Hefe von Willstätter und Steibelt[1], die auf rascher Verflüssigung der Hefe mit abtötenden Mitteln, Neutralisieren der auftretenden Säure und Einstellen der günstigen Wasserstoffzahl beruht, ließ sich auf Lactase übertragen und gab Werte, die nach der Erfahrung als wahrscheinlich anzusehen sind.

Wird die Hefe mit dem abtötenden Mittel sorgfältig verrieben, so tritt im allgemeinen keine Gärung mehr ein, aber Ausnahmen kamen vor, sogar nach zweitägiger Einwirkung von Chloroform und Toluol. Darauf muß man sorgfältig achten. Wenn bei maltasefreien oder maltasearmen Hefen die Gärwirkung manchmal hartnäckig andauert, so wird das Vorhandensein einer kleinen Maltasemenge oder ein Plus von Maltase vorgetäuscht. Bei der Lactase wird durch Gärung der Zeitwert im entgegengesetzten Sinne entstellt, so daß er zu niedrig ausfällt. Es wäre am besten, die Analyse so zu vervollkommnen, daß nach der Zeitwertbestimmung die Hydrolyse bis zum Ende weitergeführt würde, wobei ein Zuckerverlust durch Gärung nicht unbemerkt bliebe.

Die Bestimmung wurde wie für Maltase ausgeführt. 1 g frische Hefe von bestimmtem Trockengewicht (besser ein Mehrfaches davon) verreiben wir in einem Bechergläschen mit dem Glasstab mit 3 bis 4, selten etwas mehr Tropfen Chloroform 4 bis 5 Minuten lang, bis die Verflüssigung vollkommen ist. Die [178] Hefe wird mit 5 ccm Wasser verdünnt und mit 1proz. Ammoniak neutralisiert, wovon meist einige Zehntel bis zu 1 ccm erforderlich sind. Dann spült man die Hefe quantitativ mit Lactose und Puffer in ein Meßkölbchen.

Die Lactasezeitwerte unserer Hefen, die auf der folgenden Seite in der Tab. 3 zusammengestellt sind, bewegen sich ähnlich wie die Maltasezeitwerte der früher untersuchten in weiten Grenzen. Die günstigsten Kulturen des S. fragilis und der Berliner Milchzuckerhefe 60a übertreffen in den Lactasezeitwerten von ungefähr 10 bis 20 die Maltosespaltung der besten bisher analysierten Brauerei- und Brennereihefen. Aber die Lactasewerte sind merkwürdig schwankend. Sie hängen vom physiologischen Zustand der Hefe in einer noch nicht zu erklärenden Weise ab, wahrscheinlich haben die Kulturbedingungen, namentlich die Nahrung Einfluß darauf. Es wird durch die quantitative Analyse der enzymatischen Leistungen künftig möglich sein, diese Beziehungen zu untersuchen.

[1] Diese Zs. Bd. 111, S. 157 [1920].

Lactaselösungen.

Nach älteren Angaben soll frische, d. h. nicht getrocknete Hefe zwar Invertin, aber nicht Maltase und Lactase an Wasser abgeben. „Es gilt indessen für alle diese Enzyme, daß sie nicht nur von der lebenden, sondern auch von der abgetöteten, aber noch unversehrten Hefezelle zurückgehalten werden. In allen Fällen bildet für sie die Zellmembran eine schützende Schicht. Sie muß entweder mechanisch, viel schwerer als angenommen wurde, oder durch enzymatischen Abbau zerstört werden.“ Wie nach diesem Ergebnis einer Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE [1] die früheren Anschauungen hinsichtlich der Exosmose des Invertins zu korrigieren sind, so ist andererseits auch die Angabe nicht stichhaltig, daß Lactase und Maltase im Gegensatz zum Invertin nur nach Trocknung der Hefe mit Wasser ausgezogen werden. Für die Maltase ist bereits vor kurzem nachgewiesen worden, daß sie aus Hefe ohne ihre Trocknung herausgelöst werden kann, wenn die auftretende

[179] Tabelle 3. Zeitwerte einiger Milchzuckerhefen.

Nr.	Datum	Hefe	Nährlösung	Menge g	Trokkengehalt %	Versuchszeit Min.	Cu mg	Spaltung %	Lactasezeitwert
1	1921 11. III.	S. fragilis	Hefedekokt	0,75	25	300 420	75,9 78,9	49 62	52 50
2	10. V.	..	..	0,5	25	120	75,3	47	17
3	5. VII.	..	..	1,0	30	240	77,3	55	60
4	17. VI.	..	Bierwürze	0,25	28	3930 5700	65,6 66,4	14 17	2880 2700
5	22. VI.	Dieselbe Probe, vom Gären zurückgewonnen		0,25	28	4410	64,4	13	2880
6	1. VII.	S. fragilis	Bierwürze	0,5	29	3000	69,9	29,5	1560
7	11. VII.	..	..	1,0	20	285	68,0	24,5	300
8	18. VII.	..	.	0,8	33	1440	72,4	39	620
9	6. V.	Berlin Sp. 60a	anorg. Nährlös. mit Pepton	0,25	30	45 120	69,3 77,4	27 56	11 7
10	24. V.	.. .. 60a	kalter Malzauszug	0,25	25	120 240 480	67,7 70,8 77,3	21,5 33 55	35 34 25
11	25. VII.	,, ,, 60a	anorg. Nährlös. + Malzauszug	1,0	25	45	71,4	35	25
12	27. VII.	,, ,, 102	anorg. Nährlös. + Malzauszug	1,0	26	120	70,4	31	60

[180] Säure neutralisiert wird. Die früheren negativen Beobachtungen sind auf die in der abgetöteten Zelle entstehende Säure zurückzuführen, auf die zerstörende Wirkung, die sie auf die empfindlichen Enzyme ausübt, und auf die hemmende Wirkung, die den Nachweis der doch in Lösung vorhandenen, aber nur in neutralem Medium gut wirkenden Enzyme verhindert.

Für die Lactase gilt das Nämliche wie für Maltase. EMIL FISCHERS[1]) Angaben für das Verhalten reiner Milchzuckerhefe lauten: „Weder die frische, noch die an der

[1] II. Abhandlung, Liebigs Ann. der Chem. (im Druck).

[1]) Chem. Ber. Bd. 27, S. 3479 [1894], und zwar S. 3481.

Luft getrocknete Hefe gab an Wasser von 30° im Laufe von 20 Stunden das Milchzuckerenzym ab, wohl aber fand dies statt, als die lufttrockene Hefe mit Glaspulver sorgfältig verrieben war."

Es ist unerläßlich, die Auflösung der Enzyme aus den Pilzen mit quantitativen Analysen zu verfolgen. Man erkennt erst dann die Hindernisse, die zu überwinden sind, um Verfahren auszuarbeiten, die einigermaßen gleichmäßige Resultate geben. Dies gilt besonders dann, wenn die Beschaffenheit, der Enzymgehalt und die Widerstandsfähigkeit des Pilzes von Rasse zu Rasse und dann noch von Kultur zu Kultur wechselt, und es gilt besonders für die empfindlichen Enzyme, zu denen die Lactase zählt. Während bei der Invertindarstellung die Enzymausbeute im Extrakt + Heferückstand gewöhnlich gleich, unter Umständen sogar erheblich größer als im Ausgangsmaterial ist, pflegt die Bestimmung der Lactase in den Hefeauszügen + Rückständen Verluste anzuzeigen.

Um ohne Trocknung aus der Hefe Lactase zu isolieren, wurde die Hefe, nämlich 5 g S. fragilis (vom Zeitwert 300) in frischem Zustand durch Verreiben während etwa 10 Minuten mit 1 ccm Chloroform verflüssigt, dann mit 7 ccm Wasser verdünnt und vorsichtig mit 1proz. Ammoniak (1,1 ccm) neutralisiert. Im Laufe von 6 Stunden war die Flüssigkeit wieder merklich sauer, sie verbrauchte noch 0,3 ccm Ammoniak, dann entstand keine Säure mehr. Nach einem Tage, besser nach zwei bis drei Tagen, filtrierten wir die Lactaselösung ab; die Ausbeute, recht schwankend bei verschiedenen Versuchen, [181] betrug beispielsweise 39 (nach einem Tag) und 77 % (nach drei Tagen).

Es ist mühsamer und nicht ergiebiger, die enzymatische Freilegung zu ersetzen durch weitgehende Zerstörung der Zellstruktur des Pilzes[1]. So verarbeiteten wir dieselbe Kultur von S. fragilis nach der gleichen Art und Weise der Verflüssigung und Neutralisation durch zweistündiges Verreiben mit etwas Kieselgur und viel Seesand (5 g Hefe, 1,5 g Gur, 20 g Sand). Dann schüttelten wir die Masse 30 Minuten lang mit Wasser (25 ccm) an und fanden im Filtrat eine Ausbeute von 58 % der Hefelactase.

	Lösung, entsprechend g Hefe	Versuchszeit Min.	Cu mg	Spaltung %	Zeitwert
Nach 1 Tag	0,54	270	67,4	20	780
Nach $2^1/_2$ Tagen. . . .	0,70	180	69,4	28	390
2 Stunden zerrieben . .	0,46	120	65,4	14	520

In einem Beispiel der Darstellung von Lactase aus luftgetrockneter Hefe ohne Zerkleinerung und ohne Toluolzusatz verarbeiteten wir 2 g getrockneten S. fragilis vom Zeitwert 60 mit 20 ccm Wasser unter sorgfältigem Neutralisieren (Tüpfeln auf Lackmus) der entstehenden Säure mit 1proz. Ammoniak. Dafür waren sogleich 0,4 ccm, nach 2 Stunden wieder 0,6, nach 6 weitere 0,6, nach im ganzen 22 Stunden noch 0,2 ccm erforderlich. Nach einem Tage trennten wir die Lactaselösung (16 ccm, entsprechend 1,6 g Hefe) mit der Zentrifuge ab und fanden in ihr 81 % der theoretischen Enzymmenge. Diese Lösung hat für die Bestimmung der Zeitkurve gedient.

[1] Vgl. dazu R. Willstätter und F. Racke, Liebigs Ann. der Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 38.

Lösung aus 0,8 g trockener Hefe, Versuchszeit z. B. 90 Minuten, Cu 75,8 mg, Spaltung 49%, Zeitwert 75.

Lactosegärung.

Die Gärwirkungen der Milchzuckerhefen bieten bei quantitativer Beobachtung ihres Verlaufs große Unregelmäßigkeiten, [182] die sich nur so verstehen lassen, daß die enzymatische Ausrüstung dieser Hefen in hohem Maße veränderlich ist. Die Verschiedenheiten des Gärverlaufs treten bei vergleichenden Versuchen mit Lactose, mit Gemischen von Glucose und Galaktose und mit den einzelnen Hexosen, am einfachsten mit der Glucose, zutage. Sie lassen sich erklären, wenn man annimmt, daß Lactase und die den Traubenzucker vergärende Zymase und eine direkt die Lactose vergärende Lactozymase ganz unabhängig voneinander, jede in ihrer wirksamen Menge veränderlich, nebeneinander in der Hefe auftreten. Man kann daher auch nur zu gleicher Zeit mit der nämlichen Hefeprobe ausgeführte Gärversuche mit den verschiedenen Zuckern zum Vergleich benützen, Versuche mit verschiedenen Kulturen vervollständigen nur das Bild von der veränderlichen Zusammensetzung des beteiligten Enzymgemisches.

Die Gärversuche wurden zumeist unter den von Willstätter und Steibelt[1] in der Arbeit über das Gärvermögen maltasearmer Hefen angegebenen Bedingungen untersucht (20 ccm 5proz. Lösung von Lactosehydrat, Glucose u. a., die 0,2 g trockener Hefe entsprechende Menge frischer Hefe, konstante Temperatur, gewöhnlich 30°, gelindes Schütteln, das nur bei den ersten Versuchen noch nicht durchgeführt wurde; Anwendung von Nährstoffen unterblieb öfters). Aus den Beobachtungen werden die „Halbgärzeiten" hervorgehoben. Um die Zeiten der halben Vergärung und der halben Hydrolyse zu vergleichen, ist der Lactasezeitwert, der sich auf 1 g Hefe in 50 ccm 5proz. Lactoselösung bezieht, mit 2 zu multiplizieren, da im Gärversuch nur 0,5 g Hefe in 50 ccm wirken.

Milchzuckerhefe kam zur Beobachtung (Versuch I, Abb. 2), die Lactose viel rascher zu vergären vermag (Halbgärzeit 250) als das äquivalente Gemisch von Glucose und Galaktose (Halbgärzeit 860). Solche Hefe wird viel Lactozymase enthalten und Milchzucker direkt vergoren haben. Bei diesem Versuch mit dem Gemisch trat, als annähernd 40% desselben vergoren waren, eine auffallende Verlangsamung ein (wir [183] beobachteten fast eine Stunde lang keine Kohlensäureblase), und dann wieder Ansteigen der Gärung zu einer gleichmäßigen Geschwindigkeit. Diese Unterbrechung rührt von der Umstellung der Hefe von der Glucosever-

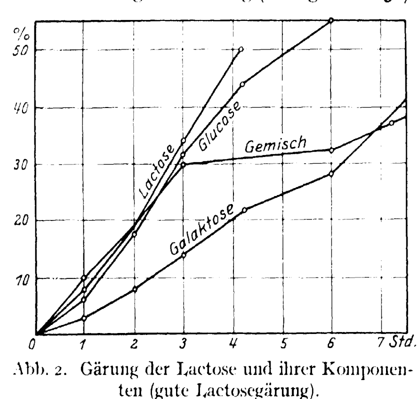


Abb. 2. Gärung der Lactose und ihrer Komponenten (gute Lactosegärung).

[1] Diese Zs. Bd. 115, S. 211 [1921], S. 218.

gärung auf die Galaktose her (s. auch Abb. 3 und Versuch III, wo die Gärkurve des Gemisches von Glucose + Galaktose aus einer steileren ersten und nach einem Knick-

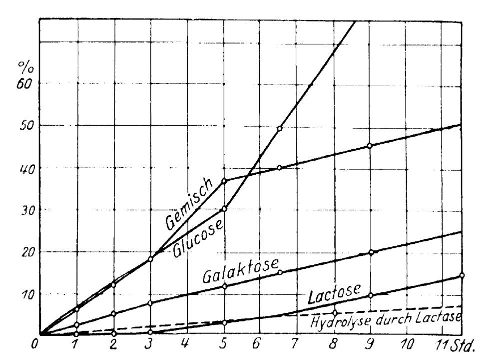


Abb. 3. Gärung der Lactose und ihrer Komponenten und Lactosespaltung (schlechte Lactosegärung).

punkt flacheren zweiten Hälfte [184] besteht). Als dieselbe Hefe, nämlich die gewöhnte, ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen auf das Gemisch (Versuch Ib) einwirkte, war der Verlauf ein anderer, ebenso rasch wie mit Lactose; die Verlangsamung trat nun erst nach Vergärung von mehr als 60% des Gemisches ein. Dieselbe Hefe, die frische Kultur, wurde auch unter gleichen Bedingungen mit Glucose und mit Galaktose geprüft und gab natürlich für erstere eine günstigere Halbgärzeit. Galaktose gärt dementsprechend anfangs langsamer als Glucose + Galaktose, hat aber kürzere Halbgärzeit als das Gemisch, weil die Umstellung des Zymasesystems früher bei reiner Galaktose einsetzt als im Gemisch.

Versuch I. (14. II.) Mit S. fragilis (0,2 g trocken) bei 30° ohne Schütteln.

Minuten	60	120	180	250	300	440	600	860	
Lactose	24	56	98	**144**	173	216			ccm
Glucose + Galaktose	29	56	86	89	94	106	129	**144**	,,
Glucose	21	52	92	127	**159**	195			,,
Galaktose	7	23	40	63	81	111	**147**	210	,,

Versuch Ib. (15. II.) Mit frischer Hefe für Lactose, mit der an Glucose + Galaktose gewöhnten Hefe des Versuchs I für das Gemisch.

Minuten	30	60	140	170	210	240	270	300	335	380	
Lactose	6	16	65	93	119	139	**151**	169	185	195	ccm
Glucose + Galaktose . .	8	28	70	103	128	**143**	150	154	161	187	,,

Auch der entgegengesetzte Fall kam vor. Kulturen von S. fragilis (Versuch II) vermochten den Milchzucker nur langsamer zu vergären (Halbgärzeit 540) als den Traubenzucker und als das Gemisch von Traubenzucker und Galaktose (Halbgärzeit 390), obwohl die Hefe zymatisch gut ausgerüstet war.

Versuch II. (21. II.) Mit S. fragilis (0,2 g trocken) bei Zimmertemperatur.

Minuten	60	120	180	240	390	480	540	720	
Lactose	11	24	37	54	100	128	**145**	200	ccm
Glucose + Galaktose	17	31	57	83	**142**	159	168	200	,,

Dasselbe Ergebnis — viel Zymase, wenig Lactozymase — fanden wir bei einer anderen Kultur von S. fragilis, mit der vergleichsweise Lactose, Glucose, Galaktose und Gemisch beider [185] vergoren wurde (Versuch III, Abb. 3). Die Halbgärzeit für Lactose (1740) war viel größer als die für Glucose (390), Glucose + Galaktose (690) und sogar größer als die für Galaktose (1290). Dennoch war die Halbgärzeit für Lactose viel kürzer als die Zeit der halben Hydrolyse unter den günstigsten Bedingungen.

Versuch III. (21. VI.) Mit S. fragilis vom Zeitwert 2880 (0,2 g trocken) bei 30° unter Schütteln.

Minuten	60	120	180	300	390	540	690	1290	1740	
Lactose a)	0	0	0	7	13	26	41	97	**144**	ccm
,, b)	0	0	3	16	23	34	50	120	152	,,
Glucose + Galaktose .	17	33	51	105	112	133	**142**	176	—	,,
Glucose	18	37	52	85	**140**	187	226	—		,,
Galaktose	7	14	20	31	40	55	74	**142**	—	,,

Andererseits beobachteten wir bei der höchst lactasereichen Berliner Hefe (Sp. 60a vom Zeitwert 7 bis 11, also Zeit der halben Hydrolyse unter den Gärbedingungen 14 bis 22) äußerst langsamen Verlauf (Versuch IV) der Lactosegärung, übrigens auch der Glucosegärung.

Versuch IV. (7. V.) Mit Berliner Hefe 60a vom Zeitwert 7 bis 11 (0,2 g trocken) bei 30°.

Minuten	120	210	240	340	450	545	750	930	1230	
Lactose	18	33	37	51	70	89	118	**144**	195	ccm
Glucose	10	16	19	27	40	55	80	104	**144**	,,

Zwischen Lactasegehalt und Geschwindigkeit der Lactosegärung gibt es gar keine Beziehungen.

Bei der Maltose war auf Vergärung ohne Spaltung daraus geschlossen worden, daß praktisch maltasefreie Hefen diesen Zucker vergären. Für die Frage, ob Lactose ebenfalls direkt vergoren werden kann, ist die Entscheidung durch den Vergleich von Hydrolyse und Gärung bei lactasearmen Hefen zu suchen. Unter vielen Kulturen von S. fragilis wurde nur eine auffallend lactasearme, nämlich vom Zeitwert 2880 erhalten (21. V., Beispiel des Vers. III und der Abb. 3). Der niedrige Lactasewert war in diesem Fall konstant, auch nach der Verwendung der Hefe für die Gärung fanden wir ihn genau bestätigt. Ein ähnliches wie das hier zu beschreibende [186] Verhältnis zwischen Hydrolysen- und Gärungszeit wurde allerdings auch bei einer anderen Kultur (20. V.) von S. fragilis gefunden, aber da hier vor und nach der Gärung der Lactasewert ungleich ausfiel, eignet sich das Beispiel nicht für unsere Schlußfolgerung. Im Versuch mit der lactasearmen Hefe eilt die Gärung weit der nicht unter denselben, sondern sogar unter optimalen Bedingungen ermittelten Hydrolyse voraus, so daß

die 50proz. Hydrolyse dreimal mehr Zeit, die 75proz. Hydrolyse siebenmal mehr Zeit erfordert als die entsprechende Vergärung:

%	Hydrolyse		Gärung		
	a	b	a	b	
25	1 400	1 500	1010	1010	Minuten
50	5 520	5 760	1740	1680	„
75	16 500	18 480	2460	—	„

In anderen Beispielen ist die unter optimalen Bedingungen bestimmte Geschwindigkeit der Hydrolyse ausreichend und manchmal weit größer als für die indirekte Vergärung erforderlich wäre. Aber unter den Bedingungen der Gärung erfolgt die Spaltung des Milchzuckers durchaus nicht in der Zeit, die nach Abtötung der Hefe, Neutralisation und nach Pufferzusatz ermittelt wird. Es ist überhaupt noch nicht vorgekommen, daß unter den Bedingungen der Gärung Lactasewirkung nachgewiesen wurde. Wir haben 9 Versuche der Milchzuckervergärung nach Entbindung von 25 bis 57% der theoretischen CO_2-Menge unterbrochen und den übrig gebliebenen Zucker untersucht. Der Quotient aus Reduktionswirkung und Drehungsvermögen würde nicht entscheiden lassen, ob mehr Lactose oder Galaktose übrig geblieben ist, aber der in vielen Fällen ermittelte Wert stimmt nur unter der Voraussetzung, daß Lactose übrig geblieben ist, annähernd für die noch zu erwartende Zuckermenge, während unter der Annahme, daß Galaktose vorläge, ein Verlust von über 40% derselben eingetreten sein müßte. Einfacher und beweisend ist die Prüfung des Restzuckers mit Phenylhydrazin. Dafür wurde die Gärung nach der Entwicklung von 25 bis 60% des [187] theoretischen CO_2 abgebrochen, die Flüssigkeit mit der Zentrifuge von der Hefe getrennt, noch filtriert und mit Phenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat im Wasserbad erwärmt. Glucose und Galaktose werden bekanntlich unter diesen Bedingungen mit Sicherheit durch die in der Wärme ausfallenden Osazone nachgewiesen. In keinem Fall trat Abscheidung von Osazon ein. Auch entwickelte eine solche Zuckerrestlösung mit gewöhnlicher Hefe 16 Stunden lang kein CO_2.

Beispiel: Gärversuch mit Hefe 60a vom Zeitwert 34. Nach Entwicklung von 44% des theoretischen CO_2 abgetrennt. In der Restlösung $(l = 2)\,\alpha_D = 2{,}45°$, hiernach 50% der Lactose noch vorhanden. In 2 ccm Restlösung ergab die Zuckerbestimmung 59 mg Cu, entsprechend 45 mg Lactosehydrat; hiernach noch vorhanden 47% der Lactose. Keine Osazonabscheidung in der Wärme.

In der lebenden, gärenden Hefe wirkt die Lactase nicht wie in der abgetöteten. Entweder ist die Lactase noch gar nicht in dem von uns quantitativ bestimmten Betrage in der lebenden Hefe vorhanden, entsteht erst nach der Vergiftung aus einem Zymogen, oder wahrscheinlicher, die Lactose findet in der lebenden Hefezelle nicht die Bedingungen, unter denen sie der enzymatischen Hydrolyse so unterliegt wie unter den für die quantitative Bestimmung ausgewählten.

Wenn bei der lactasereichen zymasearmen Hefe im Gärversuch die Lactose zunächst der Hydrolyse anheimfiele, so würden ihre Komponenten aus der Hefezelle wieder in die Zuckerlösung hinaus diffundieren. Solches tritt wirklich ein bei Rohr-

zuckervergärung durch Hefe von gewöhnlichem Invertingehalt. Es ist bekannt, daß die Inversion der Gärung vorauseilt. In den Rohrzuckerrestlösungen fanden wir in einem Falle überwiegend, in den andern Fällen ausschließlich Monosen, immer mehr Fructose als Glucose.

1. Beispiel: Vergärung von 20 ccm 9,5proz. Rohrzuckerlösung mit 2 g 20proz. Löwenbräuhefe. Nach Entbindung von 16,6% des theoretischen CO_2 ergab die Bertrand-Bestimmung in 0,5 ccm 71,4 mg Cu, entsprechend 36,5 mg Invertzucker; α_D der Restlösung ($l = 2$) — 3,88°. Die Flüssigkeit enthielt noch 78,9% des angewandten, hydrolysierten Zuckers, bestehend aus 35% Glucose und 44% Fructose.

[188] 2. Beispiel: Gärversuch mit 20 ccm 4,75proz. Rohrzuckerlösung und 1 g Hefe. Nach Entbindung von 53% des möglichen CO_2 ergab die Bestimmung mit 2 ccm Restlösung 73,4 mg Cu, entsprechend 37,6 mg Invertzucker; $\alpha_D = -1{,}96°$ ($l = 2$). Die Flüssigkeit enthielt noch 39% des angewandten, hydrolysierten Zuckers, bestehend aus 10,4% Glucose und 28,6% Fructose.

Wie in diesen Fällen müßte man bei den lactasereichen Hefen Monose in den Gärungsrestlösungen auffinden, wenn die Lactase bei der Gärung funktionieren würde und zwar müßte sich so wie die Fructose aus dem Rohrzucker oder noch mehr die Galaktose in der Restlösung anreichern.

Zeitschrift für physiologische Chemie 151, S. 242 [1926].

65. ZUR KENNTNIS DER HEFEMALTASE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und EUGEN BAMANN.

Sechste Mitteilung[1]*.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 29. Oktober 1925.)

I. Abhängigkeit der Maltasewirkung von der Wasserstoffzahl.

Den Einfluß der Wasserstoffzahl auf die Wirkung der Maltase haben L. MICHAELIS und P. RONA[2] eingehend untersucht und R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[3] in einigen Versuchen geprüft. Danach soll die Wirkung optimal sein bei p_H = 6,1 bis 6,8 und bei p_H = 7,26 schwächer als bei p_H = 5,85 (nach Abb. 5 der Abhandlung von MICHAELIS und RONA, vgl. nachstehende Abb. 1), bei p_H = 7,5 geringer als bei p_H = 5,38 (Abb. 2 von MICHAELIS und RONA).

Unsere Bestimmungen (Tab. 1 und Abb. 2 und 3) ergaben ein ganz anderes Bild. Das Optimum liegt bei sehr schwach saurer bis ganz schwach alkalischer Reaktion, nämlich p_H = 6,75 bis 7,25, [243] jedoch ist p_H = 6,1 schon erheblich ungünstiger als neutrale Reaktion und 7,5 viel günstiger als 6,1.

Tabelle 1. p_H-Abhängigkeit der Hefemaltase.
(Unter den Bedingungen der Zeitwertbestimmung nach WILLSTÄTTER, OPPENHEIMER und STEIBELT, indessen mit 100 ccm Bestimmungslösung; 30°.)

Nr.	p_H	Reaktionszeit Minuten			Drehungsabnahme °			Spaltung %		
1. Enzymlösung:										
I	6,8	40,3	91,5	137,3	2,80	3,94	4,47	43,8	61,6	70,0
II	7,5	46,0	92,5	139,0	3,09	3,85	4,39	48,3	60,3	68,6
2. Enzymlösung:										
I	5,5	60,8	100,1	212,5	0,53	0,70	0,96	8,3	10,9	15,0
II	6,1	62,0	114,3	213,5	1,70	2,15	2,87	26,6	33,6	44,9
III	6,8	59,0	106,1	211,3	2,01	2,60	3,48	31,4	40,7	54,5
IV	7,5	62,6	108,4	212,7	2,05	2,61	3,35	32,0	40,8	52,4
V	8,3	63,0	112,7	213,5	0,43	0,45	0,50	6,7	7,0	7,8

[1] Die früheren Mitteilungen: Diese Zs. Bd. 110, S. 232 [1920]; Bd. 111, S. 157 [1920]; Bd. 115, S. 199 u. S. 211 [1921]; Bd. 134, S. 224 [1923/24].

* *Die fünfte Mitteilung über Maltase („Über die relative Spezifität der Hefemaltase") ist in den Abschnitt VIII eingereiht (Nr. 86).*

[2] Biochem. Zs. Bd. 57, S. 70 [1913]; Bd. 58, S. 148 [1913/14]; L. MICHAELIS, Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914, S. 71.

[3] Diese Zs. Bd. 115, S. 199, und zwar S. 202 [1921] (*Abh. 76 im VIII. Abschnitt*).

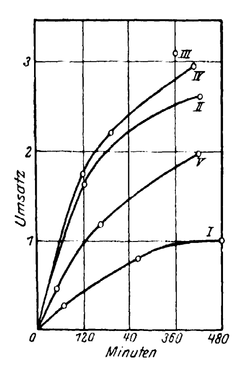
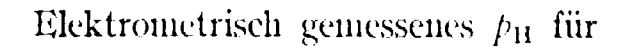


Abb. 1. Abb. 5 der Abhandlung von MICHAELIS und RONA, „Die Wirkungsbedingungen der Maltase aus Bierhefe I."

Elektrometrisch gemessenes p_H für



[244]

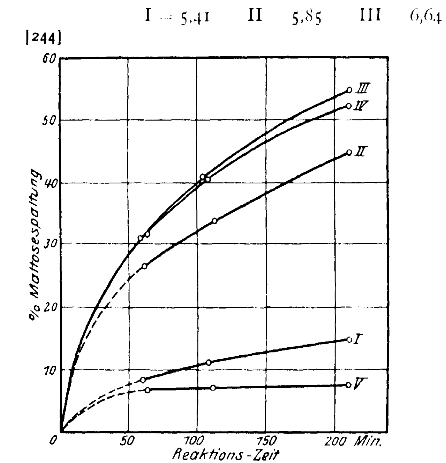


Abb. 2. Maltasewirkung bei verschiedenen p_H. (Versuch Nr. 2 der Tab. 1.)

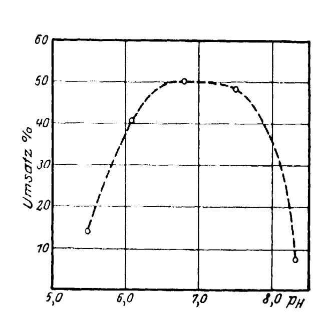


Abb. 3. p_H-Abhängigkeit der Maltase. (Versuch Nr. 2 der Tab. 1.) (Die Umsätze in der Zeit der Halbspaltung bei p_H = 6,8.)

Es war von Wichtigkeit, reichliche Puffermengen anzuwenden, da die Hefeautolysate während der Malzzuckerspaltung infolge proteolytischer Vorgänge saurer werden [1]. Für Versuch 1 der Tab. 1 diente ein durch Verflüssigung der Hefe mit [245] Essigester und Verdünnen mit dem $2^1/_2$fachen Gewicht Wasser gewonnenes Autolysat, für Versuch 2 eine nach dem Verfahren der fraktionierten Autolyse gewonnene Maltaselösung. Für jeden Ansatz wurden 10 ccm Enzymlösung, entsprechend

[1] In den obenerwähnten Versuchen von WILLSTÄTTER und STEIBELT mag die Puffermenge unzureichend gewesen sein.

1 g Trockenhefe, mit 5 g Phosphatmischung nach SÖRENSEN auf 100 ccm Bestimmungslösung angewandt. p_H, nach der Indicatorenmethode bestimmt, blieb während des Versuchs konstant. Die einzelnen Vergleichsbestimmungen bei verschiedenen p_H müssen gleichzeitig angesetzt werden, da die Maltasewerte der Autolysate sich beim Stehen ändern.

II. Kinetik der enzymatischen Maltosespaltung.

Gemäß den früheren Abhandlungen dieser Reihe ist die Kinetik der Maltasewirkung zwischen einzelnen Hefen und von Substrat zu Substrat (α-Glucoside) verschieden. Dazu kommt nach unseren Versuchen, daß die Kinetik der Wirkung von Maltase auf Maltose, die allein hier behandelt werden soll, auch in außerordentlichem Maße vom Reinheitsgrad des Enzyms abhängt.

Hefen und Autolysate folgten in allen von uns untersuchten Fällen (zwischen 30 und 60% der Maltosehydrolyse) genau der Zeit-Umsatzkurve, die WILLSTÄTTER, OPPENHEIMER und STEIBELT in der ersten Mitteilung (Abbildung S. 237, 1. Vers.) angegeben haben und die vom monomolekularen Reaktionsverlauf abweicht. Dieses traf zu bei 5 Proben von Bierhefen, die durch Zellgifte, in einer Versuchsreihe mit Essigester, in einer anderen mit Diammonphosphat, abgetötet und verflüssigt wurden, und für die daraus gewonnenen Autolysate. Diese ließen wir sowohl ganz frisch wie auch nach tagelangem Altern bei 0°, wobei die enzymatische Wirkung stark zunahm, auf Maltose einwirken und zwar entweder unter den Bedingungen der Zeitwertbestimmung bei 30° oder bei 15°. In die mit einem gealterten Autolysat bei 15° (Tab. 2) abgeleitete Zeit-Umsatzkurve fügen sich, wie die Abb. 4 zeigt, die Bestimmungen eines Versuchs mit frischem Autolysat bei 30° und diejenigen mit durch Phosphat verflüssigter Hefe (Tab. 2) genau ein.

[246] Tabelle 2.

Zeitlicher Verlauf der Maltosespaltung.

a) Mit gealtertem Autolysat bei 15° (Halbspaltungszeit bei 30°: 60,8).

b) Mit Hefe, verflüssigt durch Diammonphosphat, bei 30°.

a) Versuch mit Autolysat: (25 ccm Autolysat, entsprechend 2,5 g Trockenhefe, auf 250 ccm Maltoselösung)				b) Versuch mit Hefe: (2,5 g Trockenhefe auf 250 ccm Maltoselösung)			
Reaktionszeit Minuten	Drehungsabnahme °	Spaltung %	Halbspaltungszeit ber. n. d. I. Mitteil. (Halbspaltungszeit ber. n. d. Kurve d. I. Mitteil., Vers. 1)	Reaktionszeit Minuten	Drehungsabnahme °	Spaltung %	Zeitw. ber. n. d. I. Mitteil. (Zeitw. ber. n. d. Kurve d. I. Mitteil., Vers. 1)
43	1,14	17,8	174	9,5	1,00	15,6	38,5
65	1,50	23,4	175	19,5	1,50	23,4	44,5
98	1,85	28,9	169	29,5	1,95	30,5	45,6
125	2,16	33,8	170	39,5	2,40	37,5	38,2
185	2,49	38,9	172	54,5	2,73	42,7	38,5
247	2,85	44,6	168	69,5	3,08	48,2	38,0
305	3,07	48,0	170	100,0	3,50	54,8	38,3
462	3,58	55,9	170	141,5	4,05	63,2	37,5
1037	4,62	72,1	170	177,5	4,45	69,5	35,0

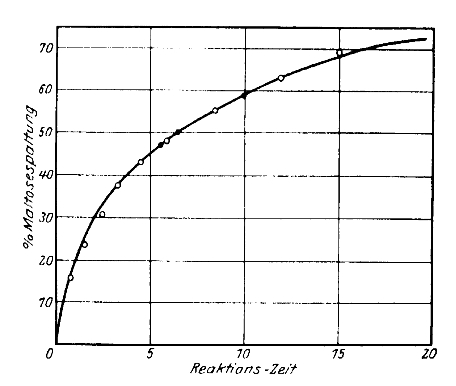


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der Maltosespaltung durch Hefe und Hefeautolysat.

(Die Kurve ist aus dem Versuch a der Tab. 2 abgeleitet unter Umrechnung der Beobachtungszeiten wie in Mitteil. III, S. 203, Fußnote; die mit o bezeichneten Punkte beziehen sich auf den Versuch b der Tab. 2 mit Hefe, durch Diammonphosphat verflüssigt, die mit • bezeichneten auf ein Beispiel mit frischem Autolysat bei 30°.)

[247] Der mit Hefe und Autolysat beobachteten Kinetik folgt die Maltase nicht mehr im Zustande ihrer Adsorbate an Tonerde und der daraus gewonnenen Elutionen. Aus der Zeit-Umsatzkurve der Abb. 4 ergaben sich dann für auf einander folgende Beobachtungszeiten Halbspaltungszeiten, die stark ansteigen, die also im Verlauf der Spaltung ungünstiger werden. Die Erscheinung beruht nicht etwa auf Zerstörung des in höherem Reinheitsgrade empfindlicheren Enzyms. Dieses ist vielmehr in der Zuckerlösung vollkommen geschützt. Man findet nämlich ebenso genau wie mit Autolysaten auch noch mit den aus Tonerdeadsorbaten gewonnenen Elutionen von Maltase (Tab. 3), deren enzymatischer Reinheitsgrad bedeutend gesteigert ist, für gleichen Spaltungsgrad das Produkt aus Enzymmenge und Reaktionszeit konstant.

Tabelle 3. Proportionalität von Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit. In Versuchen mit Maltase, gereinigt durch Adsorption und Elution.

Enzymmenge, ccm in 100 ccm Maltoselösung	Reaktionszeit Minuten	Drehungsabnahme °	Maltosespaltung %
	40	1,15	17,9
5	100	1,76	27,5
	350	3,01	47,1
	8	1,15	17,9
25	20	1,75	27,4
	70	3,02	47,2

Schon durch Eintragen von Tonerde in eine rohe Maltaselösung wird die Änderung des zeitlichen Verlaufs der Maltasewirkung herbeigeführt. Ein Beispiel (Tab. 4 und Abb. 5) dafür gibt ein Autolysat, das mit einer zur Adsorption von 50 bis 60% genügenden Menge Tonerde *C* versetzt wurde.

[248] Tabelle 4. Änderung der Kinetik einer Maltaselösung auf Zusatz von Tonerde.

Vers. A mit 10 ccm Autol., entspr. 1 g Trockenh., in 100 ccm Maltoselös.				Vers. B nach Zusatz von 0,066 g Al_2O_3			
Reaktionszeit Minuten	Drehungsabnahme °	Spaltung %	Halbspaltungszeit nach Kurve Abb. 4	Reaktionszeit Minuten	Drehungsabnahme °	Spaltung %	Halbspaltungszeit nach Kurve Abb. 4
29,0	2,36	36,9	28,6	29,0	2,23	34,9	33,7
58,3	3,15	49,3	29,5	58,3	2,97	46,4	36,0
130,0	4,40	69,0	28,5	130,0	3,30	51,6	60,0

Die gesamte Maltase, von der nur ein Teil an Tonerde adsorbiert ist, folgt einem anderen Zeitgesetz und demselben gehorchen auch die Elutionen aus Tonerde und zwar drei verschiedene, in dieser und der nachfolgenden Arbeit geprüfte Beispiele. Die Erscheinung ist derart, wie wenn die Maltase von einem ihrer Hemmung durch entstehende Glucose entgegenwirkenden Stoff befreit worden wäre. In der Abb. 6 wird eine [249] Zeit-Umsatzkurve dargestellt, die den Reaktionsverlauf im oben erwähnten Versuche mit tonerdehaltiger Maltaselösung und den mit einer Elution beobachteten zusammenfaßt.

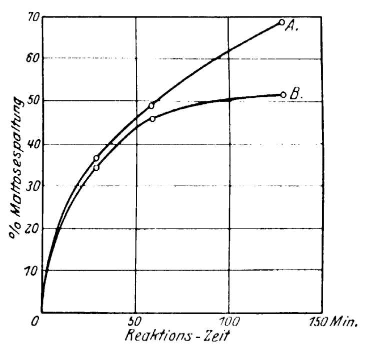


Abb. 5. Verlauf der Maltosespaltung.
A. mit Autolysat,
B. mit Autolysat und Tonerde.

Die Fälle, in denen die Maltosespaltung nach der zweiten Kurve des zeitlichen Verlaufs erfolgte, waren zahlreich. Allein die Filtration gealterter Autolysate genügte, eine Änderung der Kinetik zu bewirken, z. B. eine Annäherung von der ersten zur zweiten Kurve, während eine Änderung der Kinetik im entgegengesetzten Sinn beim Stehen der Filtrate in 4 bis 6 Stunden eintrat.

Versuch mit filtriertem Autolysat:
Halbspaltungszeit berechnet

nach der I. Kurve		nach der II. Kurve	
24,7	28,1	31,3	30,0

Versuch mit demselben Autolysat nach mehreren Stunden:
Halbspaltungszeit berechnet

nach der I. Kurve		nach der II. Kurve	
24,0	23,9	29,8	19,2

Bei einem frisch dargestellten Hefeautolysat änderte sich dagegen beim Filtrieren der zeitliche Verlauf der Maltasewirkung nicht.

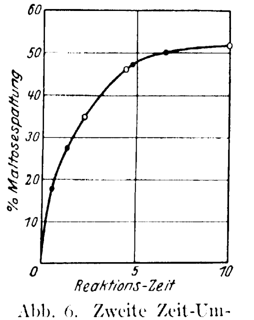


Abb. 6. Zweite Zeit-Umsatzkurve der Maltosespaltung, beobachtet:
a) mit Autolysat und Tonerde (bezeichnet o),
b) mit Elution aus Tonerdeadsorbat (bezeichnet •).

[250] Das Verhalten der Tonerdeadsorbate ist gar nicht einheitlich. Es sind mehrere Maltaseadsorbate untersucht worden, die genau oder annähernd gemäß der zweiten Kinetik reagierten, während einige andere Beispiele des zeitlichen Verlaufs von beiden Kurven abwichen. Ebenso

ungleichmäßig und verwickelt ist das Verhalten der durch Adsorption eines geringeren oder größeren Anteils gewonnenen Maltaserestlösungen, wovon die Tab. 5 einige Beispiele verzeichnet. Sie gehorchen zum Teile weder der ersten noch der zweiten Kinetik und sie fügen sich auch nicht etwa einem und demselben weiteren Zeitgesetze.

Tabelle 5. Zeitlicher Verlauf, nach teilweiser Adsorption der Maltase mit Restlösung beobachtet. (Die Bestimmungen wurden mit 100 ccm Maltoselösung ausgeführt.)

Nr.		Reaktionszeit	Drehungsabnahme	Spaltung	Halbspaltungszeit berechnet für 50 ccm	
		Minuten	°	%	nach der I. Kurve	nach der II. Kurve
1	Nach Ads. von 2/3 durch Tonerde *C*	52,8	1,37	21,4	151	220
		124	1,80	28,2	211	275
2	Nach Ads. von > 8/10 durch Tonerde *C*	34,7	1,13	17,7	132	208
		67,4	1,59	24,8	150	202
3	Nach Ads. von > 8/10 durch Tonerde *C*	60	0,92	14,4	332	577
		103	1,08	16,9	433	705
4	Nach Ads. von > 1/2 durch kurz gealterte Tonerde	45	1,50	23,4	109	154
		80,8	1,80	28,2	140	180
5	Nach Ads. von 1/4 durch Tonerdegel v. d. F. AlO_2H.	56	2,20	34,4	64	81,5
		77	2,58	40,4	63,7	79,5

Maße der Maltase.

Die Bestimmung der enzymatischen Wirksamkeit und der Vergleich der Enzymmengen, der für die Beobachtung der Adsorptionserscheinungen und für ihre Anwendungen von Wichtigkeit ist, bietet bei der Maltase größere Schwierigkeiten [251] als bei der Saccharase. Änderungen der enzymatischen Aktivität kommen bei Saccharase selten vor. Wie WILLSTÄTTER und SCHNEIDER in der zwölften Abhandlung über Invertin bemerken, ist in unserer Reihe von Untersuchungen kein derartiger Fall beobachtet worden, während allerdings vor kurzem H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1] auf Grund von Versuchen von H. v. EULER und I. LINDSTÅL über Beispiele des Überganges von Saccharase beim Erwärmen aus einem inaktiven Zustand in einen aktiven berichten. Unterschiede in der Reaktionskinetik treten beim Invertin allerdings auf[2], allein sie sind nicht so bedeutend, daß die Analyse dadurch häufig und wesentlich gestört worden wäre. Es ist freilich möglich, daß manche in den präparativen Arbeiten vorgekommenen Verluste an Invertin nur scheinbare waren, bedingt durch Änderungen in der Kinetik.

Bei der Maltase treten diese Erscheinungen in den Vordergrund. Im folgenden wird gezeigt, daß in allen Hefeauszügen, wenn sie nur vorsichtig genug aufbewahrt

[1] Diese Zs. Bd. 145, S. 130, und zwar S. 135 [1925].

[2] Vgl. z. B.: R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 123, S. 1, und zwar S. 63 [1922], und vollständiger bei R. KUHN in „Die Fermente und ihre Wirkungen" von C. OPPENHEIMER Bd. 1, S. 261 [1925].

werden, die Maltasewirksamkeit ansteigt. Es ist also zwar möglich, die Maltasewerte zu bestimmen, aber nur scheinbare Enzymmengen. Ein zweiter Umstand, wodurch der Vergleich der Maltasemengen gestört und vereitelt wird, ist die Veränderlichkeit der Kinetik des Enzyms.

Die enzymatische Wirksamkeit der Maltase wird nach dem Vorbild des Invertins durch den Zeitwert gemäß der Bestimmung von WILLSTÄTTER, OPPENHEIMER und STEIBELT ausgedrückt oder besser im Sinne des Vorschlages von WILLSTÄTTER und KUHN[3] durch das Reziproke, das der enzymatischen Konzentration direkt proportional ist. Nach R. WILLSTÄTTER, R. KUHN und H. SOBOTKA[4] ist als Maltasewert [252] (M.W.) das 1000fache des reziproken Maltasezeitwertes bezeichnet worden. Eine Bierhefe (Löwenbräuhefe R d 1/IV) wies z. B. den Maltasezeitwert 34 auf, daher Maltasewert 29,4.

Maltaseeinheit und zwar scheinbare[1]), die mit M.-[e]. bezeichnet werden soll, sei die Enzymmenge in 1 g Trockensubstanz vom Zeitwert 1, also die Enzymmenge, welche 2,5 g Maltosehydrat in 50 ccm Lösung bei $p_H = 6{,}8$ und bei 30° zu 50% in 1 Minute spaltet.

M.W. ist die im 1000fachen der unserer Bestimmung zugrunde liegenden Menge enthaltene Anzahl von Einheiten, also die Anzahl in 1 kg Trockenhefe.

Der Ausdruck M.-[e]. ist zweckmäßig noch durch Angabe der Kinetik zu ergänzen, die der Berechnung zugrunde liegt; $[e_1]$, $[e_2]$ sind nach den Zeit-Umsatz-kurven von Abb. 4 und Abb. 6 bezeichnet.

Wenn diese Maße des Enzyms bei den in der nachstehenden Mitteilung beschriebenen Versuchen der Trennung von Maltase und Saccharase angewendet werden, so ist es kaum zu entbehren, die beiden Enzyme mit gleichartigen Maßen zu bestimmen. Aus dem Vergleichszeitwert des Invertins, der unter ähnlichen Bedingungen wie der Maltasezeitwert bestimmt wird[2]), leitet sich die Saccharase-Vergleichseinheit ab, (S.V.E.), das ist die Enzymmenge, die 2,375 g Rohrzucker in 50 ccm bei 30° und bei $p_H = 4{,}3$ zu 50% in 1 Minute spaltet.

1 M.-$[e_1]$. ist in etwa 30 bis 40 g Trockenbierhefe vom Maltasezeitwert 30 bis 40 oder vom Maltasewert 33 bis 25 enthalten, 1 S.-V.E. (entsprechend 0,12 S.E.), z. B. in 2 g Trockenhefe vom Invertin-Vergleichszeitwert 2 (entsprechend Zeitwert 333).

[253] III. Bestimmung der Maltase in der Hefe.

Die Bestimmung, ja sogar der Nachweis der Maltase in der Hefe hat früher so große Schwierigkeiten geboten, daß E. FISCHER[1]] und andere Forscher zu der Ansicht

[3] Chem. Ber. Bd. 56, S. 909 [1922] (*Abh. 6*).

[4] Diese Zs. Bd. 134, S. 224, und zwar S. 226 [1923/24] (*Abh. 86*).

[1]) Analog der scheinbaren Butyraseeinheit von Magenlipase, B.-[e]., nach R. WILLSTÄTTER, F. HAUROWITZ und F. MEMMEN, Diese Zs. Bd. 140, S. 203, und zwar S. 208 [1924], und der scheinbaren Trypsinmenge, T.-[e], nach R. WILLSTÄTTER und H. PERSIEL, Diese Zs. Bd. 142, S. 245, und zwar S. 251 [1924/25].

[2]) R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 111, S. 157, und zwar S. 169 [1920]; R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 123, S. 1, und zwar S. 23 [1922] (*Abh. 62 und 48*).

[1]] Chem. Ber. Bd. 28, S. 1429 [1895].

kamen, Hefe wirke bei Gegenwart von Chloroform auf Malzzucker nicht ein. Die besonderen Verhältnisse, die hier obwalten und die Unterschiede zwischen den Wirkungen von Maltase und Saccharase bedingen, sind in den ersten Mitteilungen dieser Reihe einigermaßen klargelegt worden.

Ohne Anwendung von Zellgift kann die einsetzende Gärung die Bestimmung von Saccharase und Maltase stören. Bei Anwesenheit von Gift tritt in der Hefezelle saure Reaktion auf; dadurch entsteht ein für die Saccharase (optimales $p_H = 4,5$) günstiges, für die Maltase (optimales p_H = neutrale Reaktion) ungünstiges Medium. Die Analyse der Maltase von WILLSTÄTTER und STEIBELT ist daher auf rasche Abtötung der Hefe mit Essigester und Neutralisation der entstehenden Säure gegründet. Die Bestimmung des Maltasewertes der Hefe war die Vorbedingung für den Nachweis der direkten Maltosevergärung und sie bildet weiterhin die Voraussetzung für vergleichende Beobachtungen über die Freilegung von Saccharase und Maltase (Abschn. V).

Diese Maltasebestimmung in der Hefe unterzogen vor kurzem H. v. EULER und K. JOSEPHSON[2] in einer eingehenden Erörterung über die Frage der direkten Malzzuckergärung folgender Kritik: „Es liegt kein zwingender Beweis vor, daß es nach der Methode von WILLSTÄTTER und STEIBELT gelingt, die Gesamtheit der katalysierenden Gruppen, welche die Maltosehydrolyse in der Hefe bewirken, unabhängig von der Gärung überhaupt zur Wirkung zu bringen."

Um den Nachweis der direkten Biosegärung zu vervollkommnen, haben wir daher die für die Bestimmung der Maltase maßgebenden Umstände genauer nachgeprüft. Das analytische Verfahren der zweiten Mitteilung hat sich dabei [254] vollkommen bestätigen und noch sicherer gestalten lassen. Es wurden weitere Bestimmungsweisen geschaffen, deren Ergebnisse mit denen der ersten übereinstimmen und diese stützen. Die Methode, deren Genauigkeit ausreichend ist, wird vollends durch den Nachweis gesichert, daß eine Biose durch lebende Hefe bei Abwesenheit von Gift mit derselben Geschwindigkeit hydrolysiert wird, wie bei Anwesenheit eines allmählich wirkenden Zellgiftes oder nach vollständiger Abtötung. Auch ist es gelungen (vgl. Abschn. V), genau so viel Maltase in Lösung überzuführen als die Analyse der Hefe ergeben hat.

Wenn man versucht, nach dem bekannten Vorbild der Bestimmung von Invertin in frischer Hefe die Maltase zu ermitteln, indem man die Gärung durch Zusatz von etwas Toluol zur Maltoselösung unterdrückt, so findet man im allgemeinen zu niedrige Werte. Man muß (vgl. Mitteil. II, S. 163 u. f.) die Puffermenge vermehren, damit die im Hefekörper bei der Vergiftung auftretende Säure unschädlich gemacht wird. Dann nähern sich die Werte (Tab. 6) dem nach dem Verflüssigungsverfahren gefundenen, aber sie bleiben schwankend, schlecht reproduzierbar.

Es ist also besser, daß man die Abtötung des Pilzes und die Säureabscheidung „auf einen kurzen Zeitraum zusammendrängt". Die Verflüssigung mit Essigester

[2] Diese Zs. Bd. 120, S. 42 [1922], und zwar S. 56.

erfolgt am raschesten, viel rascher als mit Toluol und Chloroform. Bei kurzer Einwirkung wird aber der Zymasekomplex nicht zerstört, Gärung während der Bestimmung also nicht ausgeschaltet. Die Bedingungen der Analyse sollen deshalb dahin ergänzt werden, daß man immer zur Bestimmungslösung Toluol zufügt, 5 bis 6 Tropfen auf 100 ccm, ähnlich wie schon WILLSTÄTTER und STEIBELT[1] speziell bei maltasearmen Hefen einen weiteren Zusatz von Gift zur Bestimmungslösung nötig fanden.

Die Verflüssigungszeit darf nicht zu kurz sein, da sonst die bei der Abtötung einsetzende Säurebildung in der Hefezelle noch weiter andauert und der Puffer, wenn

[255] Tabelle 6.
Maltasezeitwerte nach dem Verfahren der Invertinbestimmung, aber mit größeren Puffermengen. (Die Bestimmungen wurden mit 100 ccm Maltoselösung ausgeführt.)

Angewandte Hefe	Phosphatpuffer (g) v. $p_H = 6,8$	Zellgift	Reakt.-Zeit Minuten		Drehungsabnahme °		Spaltung %		Zeitwert	
Rc 20/V v. Zeitw. 41 und zwar 1,1 g	0,21	Toluol	103,7	198,5	2,50	3,55	39,1	55,5	99,8	82,5
	0,21	Tol. + Essigest.	105,0	165,5	3,05	3,75	47,7	58,7	64,3	59,4
	0,5	Toluol	91,5	140,0	2,98	3,65	46,6	57,0	59,6	53,9
	1,0	..	107,0	164,0	3,63	4,33	56,8	67,6	41,5	41,8
	1,0	..	91,0	142,8	3,25	4,00	50,9	62,5	47,5	43,7
	5,0	..	89,2	137,6	3,06	3,75	47,8	58,7	54,1	49,2
	1,0 (Diammonphosph.)	..	88,3	136,8	3,15	3,80	49,2	59,4	49,0	46,5
Rd 1/II v. Zeitw. 51 und zwar 1,0 g	1,0	Toluol	107,8	174,0	3,04	3,85	47,5	60,1	59,9	53,2
	2,0	..	105,0	172,5	3,12	3,90	48,8	60,9	55,1	51,0
	3,0	..	103,0	169,6	3,14	3,90	49,0	60,9	53,5	50,8
	5,0	..	61,8	173,2	1,90	3,80	29,8	59,4	94,5	54,5

seine Menge [256] nicht erheblich vermehrt wird, nicht rasch genug das günstige p_H einstellt. Ist die Verflüssigung unvollständig, so sieht man unter dem Mikroskop noch unversehrte Hefezellen neben den anderen, deren Struktur zerstört und deren Plasma an die Wand gedrängt ist, deren Vakuolen entleert und glanzlos sind. Während die Vorschrift Behandlung mit Essigester für die Dauer von 4 bis 6 Minuten anrät, halten wir es für vorsichtiger, die Verflüssigung 10 bis 15 Minuten dauern zu lassen, dann zu verdünnen und mit Ammoniak zu neutralisieren. Bei einer Einwirkung von 10 Minuten bis über 1 Stunde finden wir den Maltasewert konstant. Bei zu langer Dauer, z. B. 4 Stunden Einwirkung des Essigesters vor dem Beginn des Neutralisierens (Nr. 12 der Tab. 7), leidet die Maltase allmählich durch die gebildete Säure. Die angegebene Puffermenge, 0,12 g $Na_2HPO_4 \cdot 2HO_2 + 0,09$ g KH_2PO_4 für den Ansatz von 100 ccm Maltoselösung, erscheint uns als etwas zu knapp. Es ist ratsam, 1 g Phosphatmischung für 100 ccm Bestimmungslösung anzuwenden; die Wasserstoffzahl bleibt dann optimal bis zum Ende der Analyse trotz der proteolytischen Vorgänge.

Bestimmung mit Hilfe von Diammonphosphat. Die Hefe läßt sich sehr gut allein mit Diammonphosphat abtöten und verflüssigen. Im mikroskopischen

[1] Vierte Mitteilung, Diese Zs. Bd. 115, S. 218 [1921].

Bilde erscheinen Zellwände und Plasma der Hefe wenig angegriffen, die Vakuolen zu einer oder zweien gesammelt und durch Aufspringen der Zellhäute entleert. Die Randformen der Hefezellen und ihrer Hohlräume treten scharf hervor. Durch das Phosphat entsteht ohne weiteres, wenn die Menge nicht übertrieben groß gewählt wird, eine für die Maltase optimale Wasserstoffionenkonzentration, nicht über 7,3; um der Einheitlichkeit der Bedingungen willen wurde auch dann noch der Puffer zur Maltose zugefügt.

Man verreibt etwa 10 g abgepreßte Hefe, deren Trockengewicht nicht unter 25% betragen darf, das ist die 2,5 g Trockensubstanz entsprechende Menge, mit 1 g feingepulvertem Diammonphosphat bis zur vollständigen Verflüssigung, die in 8 bis 10 Minuten erreicht ist. Dann verdünnt man mit Wasser auf 50 ccm und trägt je 20 ccm Suspension in die Maltoselösung ein. Die Tab. 7 zeigt in den Versuchen Nr. 3 bis 8 und [257] 14 bis 17, in denen das Ammonphosphat 5 Minuten bis 22 Stunden einwirkte, Zeitwerte von 39,8 bis 43,5, die untereinander und mit dem nach dem Essigesterverfahren gefundenen übereinstimmen. Wird aber die Menge Diammonphosphat auf 20% gesteigert, so beginnt die Maltase in einigen Stunden zu leiden, der Zeitwert fällt ungenau aus.

In den Versuchen 18 bis 21 der Tab. 7 wurde statt des Diammonphosphats die Phosphatmischung von $p_H = 6,8$ angewandt, ebenfalls mit genauer Übereinstimmung der Zeitwerte.

Bestimmung nach Verflüssigung mit Natriumchlorid. Eine weitere Art der Abtötung, wie die mit Phosphat nur durch osmotische Vorgänge bewirkt, besteht im Vermischen der Hefe mit gepulvertem Kochsalz. Mit 10% vom Gewicht der Frischhefe erfolgte in meist weniger als 10 Minuten vollständige Verflüssigung unter Säurebildung, so daß 10 ccm 1proz. Ammoniaks für 10 g Frischhefe erforderlich waren. Nach Einwirkung von 10 bis 30 Minuten wurde der Hefebrei verdünnt und neutralisiert. Die Versuche Nr. 22, 23 und 29 der Tab. 7 ergaben denselben Zeitwert wie mit Essigester oder Phosphat.

Vergleich abgetöteter mit lebender Hefe. Die Schlußfolgerung aus der Maltasebestimmung in abgetöteter auf den Maltasewert der lebenden Hefe wird durch den Vergleich mit der Saccharasewirkung bestätigt. Es hat sich in sehr zahlreichen Versuchen ergeben, daß verflüssigte Hefe ebensoviel rohrzuckerspaltende Wirkung ausübt wie frische Hefe unter den üblichen Bedingungen der Invertinbestimmung, also in toluolhaltiger Rohrzuckerlösung; das die Gärung unterdrückende Toluol tötet langsam die Hefe ab und mit der enzymatischen Aktivität der Hefe während dieser langsamen Zellgiftwirkung stimmt wiederum genau überein die Wirksamkeit der lebenden Hefe unter günstigen Gärbedingungen, bei Ausschluß eines schädigenden Agens. Die Zuverlässigkeit der Invertinbestimmung in Hefe konnten schon H. v. EULER und R. BLIX[1] mit der Erfahrung begründen: „Mit der gleichen Menge ein und der-

[1] Diese Zs. Bd. 105, S. 83 [1919], und zwar S. 88.

[258] Tabelle 7.

Bestimmung der Maltase unter Abtötung mit Essigester oder Phosphat oder Natriumchlorid. (Die Bestimmungen wurden mit 100 ccm Maltoselösung ausgeführt.)

Nr.	Hefe	Verflüssigung Art	Verflüssigung Dauer	Reakt.-Zeit Minuten		Drehungsabnahme °		Spaltung %		Zeitwert	
1	Rc 20/V; 1,0 g	Essigester	30 Min.	98,3	161,5	3,43	4,08	53,6	63,8	41,4	41,0
2	,, ,,	,,	30 ,,	98,0	161,8	3,40	4,00	53,1	62,6	42,0	40,5
3	,, ,,	Diammonphosph. 10 %	5 ,,	90,0	140,0	3,26	3,85	51,0	60,0	42,5	43,0
4	,, ,,	,,	15 ,,	82,5	132,0	3,20	3,75	50,0	58,7	41,2	42,5
5	,, ,,	,,	30 ,,	88,3	133,6	3,23	3,74	50,6	58,4	42,0	43,5
6	,, ,,	,,	1 Std.	97,0	151,8	3,36	3,99	52,5	62,3	42,0	42,5
7	,, ,,	,,	3 ,,	62,0		2,87		44,8		40,2	
8	,, ,,	,,	17 ,,	95,0	159,8	3,35	4,17	52,2	65,0	41,5	40,5
9	,, ,,	Phosphatmisch. $p_H = 6,8$	30 Min.	86,2	131,5	3,27	3,86	51,1	60,3	40,6	40,0
10	,, 1,1 g	Essigester	10 ,,	90,8		3,43		53,6		41,0	
11	,, ,,	,,	30 ,,	85,2		3,30		51,5		42,3	
12	,, ,,	,,	4 Std.	79,6	148,5	3,10	3,94	48,5	61,6	45,8	46,2
13	,, ,,	,,	22 ,,	98,0	148,9	2,85	3,30	44,5	51,6	71,5	73,7
14	,, ,,	Diammonphosph. 10 %	10 Min.	89,5		3,44		53,7		40,7	
15	,, ,,	,,	30 ,,	85,0		3,35		52,3		40,5	
16	,, ,,	,,	4 Std.	79,0		3,32		51,8		40,5	
17	,, ,,	,,	22 ,,	96,5		3,55		55,5		39,8	
18	,, ,,	Phosphatmisch. $p_H = 6,8$	10 Min.	89,4		3,44		53,7		40,7	
19	,, ,,	,,	30 ,,	85,0		3,35		52,3		40,5	
20	,, ,,	,,	4 Std.	81,3		3,36		52,5		39,5	
21	,, ,,	,,	22 ,,	95,5		3,50		54,7		40,7	
22	,, ,,	Kochsalz 10 %	10 Min.	107,9	171,8	3,60	4,39	56,3	68,5	42,0	42,2
23	,, ,,	,,	30 ,,	85,5	114,0	3,36	3,79	52,6	59,2	40,2	40,1
24	Rc 18/II; 1,0 g	Diammonphosph. 10 %	2 bis 3 Min.	90,1		3,38		52,8		38,4	
25	,, ,,	,,	1 Std.	32,0	90,0	2,15	3,38	33,6	52,8	38,8	38,5
26	,, ,,	,, 20 %	3 ,,	31,8	92,8	1,98	3,30	30,9	51,6	45,5	43,2
27	Rd 1/III; 0,9 g	Essigester	10 Min.	81,0	133,0	3,02	3,59	47,1	56,2	42,5	42,6
28	,, ,,	Diammonphosph. 10 %	10 ,,	81,1	130,0	3,00	3,59	46,8	56,2	42,3	42,5
29	,, ,,	Kochsalz 10 %	10 ,,	83,0	128,0	3,01	3,60	47,1	56,2	42,3	42,7

selben Hefe wird nämlich . . . die gleiche [259] Invertasewirkung erzielt, unabhängig davon, ob die Zellen durch Trocknen entwässert wurden . . . oder durch Toluol bzw. Chloroform an Zuwachs und Gärtätigkeit gehemmt wurden, oder ob die Hefe frisch zur Anwendung kam." Vergleichende Versuche von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[1] mit lebender und mit feinzerriebener Hefe sprachen zugunsten dieses Satzes. Schon bei gewöhnlicher Bierhefe ist im Vergleich zu der starken Invertinwirkung die Gärung so langsam und geringfügig, daß durch Wegbleiben des Zellgiftes kein erheblicher Fehler entsteht. Vollends erlauben die saccharasereichsten Hefen, die in der neunten Abhandlung über Invertin beschrieben sind, mit aller Genauigkeit den Vergleich der Invertinwirkung von lebender Hefe bei Abwesenheit und bei Gegenwart eines Zellgiftes auszuführen, denn hier kommt die Gärung neben der Spaltung gar nicht in Betracht (Halbgärzeit z. B. $2^1/_2$ Stunden, Halbspaltungszeit für Rohrzucker unter Gärbedingungen 15 Sekunden). Die Versuche mit und ohne Toluolzusatz (Tab. 8), für deren

[1] Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 12.

Ausführung wir Herrn GERHARD KÜNSTNER zu Dank verpflichtet sind, ergaben vollkommene Übereinstimmung.

Tabelle 8.
Bestimmung des Invertins in invertinreicher Hefe mit und ohne Zellgift.
(Bedingungen der Vergleichszeitwertbestimmung.)

Nr.	Versuchsbedingungen	mg Trockenhefe angew. f. 25 ccm Lösung	Reaktionszeit Minuten	Drehungsabnahme °	Spaltung %	Zeit für 50 proz. Spaltung	Zeitwert
1a	ohne Toluol	6,70	13,0	4,52	66,0	9,0	20,2
1b	mit ,,	6,70	14,5	4,79	70,0	9,0	20,2
2a	ohne ,,	7,22	8,7	2,17	31,6	15,2	36,6
2b	mit ,,	7,22	8,3	2,07	30,2	15,4	37,0
3a	ohne ,,	8,15	14,4	3,59	52,4	13,7	37,0
3b	mit ,,	8,15	14,2	3,55	51,8	13,6	36,8
4a	ohne ,,	10,10	6,9	3,07	44,8	7,9	26,5
4b	mit ,,	10,10	7,0	3,07	44,8	8,0	26,8

[260] Hefen von den Zeitwerten 20 bis etwa 500 sind für die Invertinbestimmung ohne Vergiftung geeignet. Invertinarme Hefen, z. B. Brennereihefen vom Zeitwert 1000, erfordern Gegenwart von Toluol, weil sonst die einsetzende Gärung mit der Zeit ansteigende Invertinwirkung vortäuscht. Invertinärmste Hefen, zu denen wir in der elften Arbeit über Invertin gelangten, lassen sich, wie dort gezeigt wurde, nicht mehr in der üblichen Weise analysieren; man muß sie wie für die Maltasebestimmung zuerst durch Zellgift abtöten, wahrscheinlich, weil die noch vorhandene geringe Enzymmenge für den Zucker nicht mehr genügend zugänglich ist.

Die Beobachtungen der elften Arbeit über Invertin scheinen auch auf das Verhalten der Maltase in der Hefe Licht zu werfen. Die untersuchten Hefen sind durchwegs maltasearm. Um die verwickelten Verhältnisse zu erklären, die früher den Nachweis und die Bestimmung der Maltase in frischer Hefe vereitelten, scheint die Berücksichtigung ungeeigneter Acidität in der absterbenden Zelle nicht zu genügen. Der Vergleich mit invertinärmsten Hefen kann zur Klärung der Erscheinung beitragen. In diesen ist das noch übrige Invertin weder für Säuren, noch Alkalien, noch für Rohrzucker leicht erreichbar. Es ist möglich, daß die Maltase, deren Rolle für die Gärung eine ganz unwichtige ist, für den in die Zelle eintretenden Zucker erst durch die starken Veränderungen bei der Abtötung genügend zugänglich gemacht wird.

Beispiel: Bierhefe, durch 2stündige Einwirkung von 0,15 n-H_2SO_4 invertinarm gemacht.

a) Bestimmung des Invertins nach dem üblichen Verfahren: Reakt.-Zeit: 61 Minuten, Drehungsabnahme: 0°.

b) Verflüssigung mit Essigester, Best. u. Zus. von Toluol unter Bed. d. Vergleichszeitw. (angew. 1,17 g Trockenhefe auf 100 ccm Zuckerlösung).

Reaktions-Zeit Minuten	Drehungsabnahme °	Spaltung %	Halbspaltungszeit
64,4	1,37	20,0	196
126,0	2,44	35,6	192
247,0	4,24	61,9	191

Zeitwert: 18700.

[261] IV. Direkte Vergärung der Maltose.

Die vierte[1] Mitteilung dieser Reihe handelt davon, daß die Hefe M, einige Zeit die einzige vom Berliner Institut für Gärungsgewerbe vertriebene Brennereihefe, und zwei aus der Industrie bezogene obergärige Hefen (Branntweinhefen der Sinner A.-G. und der Spiritusfabrik Stadlau bei Wien) keine Maltase oder nur Spuren davon enthalten. Merkwürdigerweise fehlt diesen Hefen der Praxis eben dasjenige Enzym, dessen Anwesenheit und Funktion nach der allgemein angenommenen Anschauung die Vorbedingung für die Vergärung des Malzzuckers sein sollte. Übrigens fielen so wichtige Hefen der Praxis auch durch ihre verhältnismäßig geringe Gärleistung auf. Die Gärungsindustrien sollten aus diesen analytischen Versuchen die Anregung entnehmen, die enzymatischen Leistungen und die Gärleistungen ihrer Heferassen quantitativ zu beobachten und neben der mikroskopischen Kontrolle bei der Auswahl und Reinzucht zu berücksichtigen.

Der Stellungnahme von H. v. Euler und K. Josephson[2] zur Frage der direkten Maltosegärung verdanken wir die Veranlassung, das Beweismaterial der vierten Mitteilung zu vervollkommnen. Zu diesem Zwecke geschah es, daß die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Maltasebestimmung im vorigen Abschnitt nachgeprüft und überzeugender gestaltet wurde. Die früheren Beobachtungen mit praktisch maltasefreien Hefen lassen sich auch durch den Nachweis ergänzen, daß unsere gewöhnlichen Bierhefen ebenfalls imstande sind, Maltose ohne vorangehende Hydrolyse durch die Wirkung einer besonderen Komponente ihres Zymasekomplexes zu vergären.

Eine Brennereihefe von noch unbekanntem Maltasegehalt, reine Branntweinhefe der Zuckerraffinerie Frankenthal, Fabrik Regensburg, war in der elften Arbeit über Invertin das Material für Invertinverminderung in der lebenden Hefe. Diese Regensburger Hefe (Vers. 1 der Tab. 9) enthält Maltase nur [263] spurenweise, die

[262] Tabelle 9. Versuche mit maltasearmen Hefen.

Nr.	Hefe bzw. Autolysat	Vorbehandlung	Invertinzeitwert	Maltasebestimmung (in 100 ccm Maltoselösung) Reakt.-Zeit Min.	Drehungsabnahme °	Spaltung %	Zeitwert bzw. Halbspaltungszeit
1	Regensb. Branntw.-Hefe	ohne	920	30	0	0	—
				1125,5	0,25	3,9	50000
				2340	0,35	5,5	53000
2	,, ,,	2 Std. mit 0,15 n-H_2SO_4	19000	1128	0,30	4,7	40000
				2340	0,37	5,8	50000
3	,, ,,	1 Std. mit 0,05 n-NaOH	25000	1127,5	0,26	4,1	50000
				2340	0,36	5,6	53000
4	Löwenbräuhefe Rd 1/III	ohne	366	60	2,93	45,9	42
5	,, ,,	2 Std. mit 0,15 n-H_2SO_4	3000	223,5	0,68	10,6	1880
				1050	1,55	24,3	2360
6	Autol. aus Reg. Branntw.-Hefe (angew. 20 ccm entsprech. 2 g Trockenhefe)			590	0,23	3,6	40000
		2 Tage Aufbew. bei 0°		327	0,15	2,3	45000
		5 ,, ,, ,, 0°		121	0,02	0,3	—

[1] Diese Zs. Bd. 115, S. 211 [1921]. [2] Diese Zs. Bd. 120, S. 42 [1922], und zwar S. 54.

Halbspaltungszeit für Maltose beträgt für die Hefemenge des Gäransatzes 100000 Minuten (am Ende der Halbgärung bestimmt 60000), die Halbgärzeit unter denselben Bedingungen 242 Minuten.

Gärversuch:	30	60	90	120	150	180	210	242 Minuten
	7,0	15,5	24,3	39,0	63,0	89,5	116,0	144,0 ccm CO_2.

Auch hier gilt, daß die Maltose in Zeiten vergoren wird, in denen die Hydrolyse gar keine Rolle spielt. Die Genauigkeit der Maltasebestimmung ist dabei belanglos. Ein nach dem im Abschnitt V beschriebenen Verfahren gewonnenes Autolysat dieser Hefe enthielt (Vers. 6 der Tab. 9) keine Maltase und bildete auch keine bei 3- bis 5tägigem Aufbewahren bei 0°.

Mehrstündige Behandlung mit 0,15n-Schwefelsäure oder 0,05n-Natronlauge änderte den spurenweisen Maltasegehalt nicht.

Wird Bierhefe nach dem Verfahren der Invertinverminderung von WILLSTÄTTER und LOWRY 2 Stunden mit 0,15n-Schwefelsäure behandelt, wobei der Invertinzeitwert von 366 zu 3000 ansteigt, so verschlechtert sich zugleich der Maltasegehalt (Vers. 5 der Tab. 9) entsprechend den Zeitwerten 42 und etwa 2000 (gef. 1880 und 2360). Diesem Werte entspräche eine Halbspaltungszeit für die Hefemenge des Gäransatzes von etwa 4000 (3760 und 4720) Minuten gegenüber einer Halbgärzeit von 167 Minuten.

Gärversuch:	30	60	90	120	150	167 Minuten
	23,8	47,4	72,4	99,4	127,0	144,0 ccm CO_2.

Es ist indessen zu berücksichtigen, daß während der Gärung eine Neubildung von Maltase wie von Saccharase erfolgt. Am Ende der Halbgärzeit wies die Hefe wieder einen Maltasegehalt entsprechend dem Zeitwert 106 auf. Wenn man nun den am Ende erreichten Maltasegehalt dem Vergleich der Zeiten für Hydrolyse und Gärung zugrunde legt, das ist die für unsere Betrachtung ungünstigste Annahme, so steht der Halbgärzeit von 167 Minuten eine Halbspaltungszeit von [264] 212 Minuten gegenüber. Besser würden die Zeiten der $^1/_8$-Gärung und -Spaltung verglichen. Denn es ist noch unberücksichtigt, daß die Maltase im Gärversuch infolge der Wegschaffung des hemmend wirkenden Spaltungsproduktes Glucose stärker wirken kann, als die Maltasebestimmung anzeigt.

V. Bildung von Enzymlösungen aus der Hefe[1].

Unsere Anschauungen über die Bildung von Lösungen der Enzyme, z. B. der Maltase aus der Hefe, hat sich in den letzten Jahren wesentlich geändert. Es gab Schwierigkeiten, Maltase aus der frischen Hefe „auszulaugen". C. J. LINTNER und E. KRÖBER[2] führten Unterschiede zwischen Saccharase und Maltase auf verhältnismäßige Schwerlöslichkeit der Maltase zurück. Und E. FISCHER[3] erklärte seinen

[1] Fortsetzung d. Abschn. A, I u. IV u. VII der ersten Abh. über Invertin, Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21].

[2] Chem. Ber. Bd. 28, S. 1050 [1895].

[3] Chem. Ber. Bd. 27, S. 3479 [1894] und diese Zs. Bd. 26, S. 60 [1898], und zwar S. 75.

Befund, daß „beim Auslaugen der Frischhefe mit Wasser" „nur das Enzym in Lösung geht, welches den Rohrzucker spaltet", mit der Annahme, daß die Diffusion aus der unversehrten Zelle nach außen bei der Maltase gehindert, bei der Saccharase nicht gehindert sei. Auch A. CROFT HILL[4] gibt an, die Maltase „does not leave the cells until they have been thoroughly dried".

Die Auflösung von Enzymen aus der Hefe, eingehend untersucht in unserer ersten Abhandlung über Invertin, beruht auf den während und nach der Abtötung der Zelle eintretenden enzymatischen Vorgängen der Freilegung. Die Kunst der Darstellung von Enzymlösungen höherer Reinheitsgrade besteht darin, die Freilegung eines Enzyms von den gesamten Vorgängen der Hefeautolyse soweit als möglich zu trennen. So gelingt es, wie in unserer Schlußarbeit (XII) über Invertin berichtet wird, Hefeautolysate darzustellen, die 150mal reinere [265] Invertinlösungen sind, als die in der ersten Abhandlung beschriebenen.

Im folgenden wird die Darstellung der Maltaselösungen so verbessert, daß man aus Frischhefe in 3 bis 8 Stunden 95 bis 100 % des in der Hefe nachgewiesenen Enzyms in wäßrige Lösungen von Zeitwerten 12 bis 2, also Maltasewerten 83 bis 500 überführt. Noch vor kurzem konnten die Versuche über Isolierung der Maltase den Eindruck[1]) hervorrufen, daß „die Maltase sehr schwer aus der Hefe abtrennbar" sei. Die vergleichende Auflösung von Saccharase und Maltase hat nun zu dem überraschenden Ergebnis geführt, daß die Maltase sogar rascher als die Saccharase freigelegt und in Lösung übergeführt wird.

Es gelang zum ersten Male ohne vorangegangene Trocknung, aus Hefe Maltaselösungen darzustellen nach dem „Neutralisationsverfahren" der ersten Mitteilung über Maltase; mit Wasser verdünnt, wurde die Hefe der Wirkung eines Zellgiftes (Toluol) ausgesetzt und die allmählich produzierte Säure von Zeit zu Zeit mit verdünntem Ammoniak neutralisiert. Das Verfahren wird nun dadurch verbessert, daß wir wie zum Zweck der Enzymbestimmung in der Hefe ohne Verdünnen mit Wasser die Einwirkung des Zellgiftes, am besten Essigester, vornehmen, um einige Zeit nach vollständiger Verflüssigung zu verdünnen, in einem Male zu neutralisieren und die Freilegung des Enzyms in einem Tag oder noch kürzerer Zeit bei Zimmertemperatur vor sich gehen zu lassen. Die Bedingungen der Bestimmung in der Hefe selbst, wobei die Maltase noch zum allergrößten Teile in der Zelle zur Wirkung gebracht wird, sind also für die Entbindung der Maltase aus der Zelle die geeignetsten.

Es ist ein geringfügig erscheinender Umstand, ob die mit Wasser verdünnte Hefe der Einwirkung von Essigester u. dgl. unterliegt oder ob das Gift zuerst einige Minuten lang auf die unverdünnte, immerhin 75 % Wasser enthaltende Hefe einwirkt. Aber dieser kleine Unterschied ist von großer Tragweite für den Verlauf des enzymatischen Protoplasmaabbaues, [267] wovon die Freilegung eines zuckerspaltenden Enzyms ein Teilvorgang ist. Man war geneigt anzunehmen, da es vorsichtiger und

[4] Journ. Chem. Soc. Bd. 73, S. 634 [1898], und zwar S. 635.

[1]) H. v. EULER und K. JOSEPHSON, Diese Zs. Bd. 120, S. 42 [1922], und zwar S. 56.

[266]

Tabelle 10.

Vergleich der Freilegung von Maltase und Saccharase aus frischer Hefe nach Abtötung in unverdünntem Zustande. (Löwenbräuhefe Rd 1/III; Invertinzeitwert 366, Maltasezeitwert 41.)

Nr.	Verflüssigung und Art der Autolyse	Dauer der Autolyse Stdn.	Maltase M.-[e_1]. in 1 g angew. Trockenhefe	M.-[e_1]. in der 1 g Trockenhefe entspr. Menge Enzymlösung	Ausbeute %	Saccharase S.V.E. in 1 g angew. Trockenhefe	S.V.E. in der 1 g Trockenhefe entspr. Menge Enzymlösung	Ausbeute %
1	Hefe vom Trockengewicht 20,8 %; mit Essigester bei 23°, gebrochen	5	0,0244	0,0133	54,6	0,4550	0,1330	29,3
		17	,,	0,0191	78,1	,,	0,3460	76,0
		24	,,	0,0189	77,4	,,	0,4250	93,5
2	Hefe vom Trockengewicht 22,7 %; mit Essigester bei 23°, ungebrochen	20	,,	0,0238	97,9	,,	0,3120	68,5
3	Hefe vom Trockengewicht 26,6 %; mit Essigester bei 23°, ungebrochen	5	,,	0,0115	47,1	,,	0,1160	25,6
		8½	,,	0,0191	78,1	,,	0,2000	43,9
		22	,,	0,0250	102,5	,,	0,4640	102,0
4	Hefe vom Trockengewicht 24,1 %; mit Diammonphosphat bei 23°, ungebrochen	5½	,,	0,0118	48,3	,,	0,1700	37,4
		8½	,,	0,0175	71,8	,,	0,2090	45,9
		22	,,	0,0226	92,6	,,	0,2540	55,9
5	Hefe vom Trockengewicht 26,6 %; mit Diammonphosphat bei 23°, ungebrochen	5	,,	0,0191	78,1	,,	0,1095	24,1
		8½	,,	0,0229	94,0	,,	0,1890	41,5
		22	,,	0,0246	101,0	,,	0,4530	99,6
6	wie 5	3	,,	0,0232	95,2	,,	0,1820	40,0
		4	,,	—	—	,,	0,3070	67,5
		5	,,	0,0265	108,5	,,	0,4300	94,4

schonender ist, die Frischhefe, verdünnt mit dem gleichen oder doppelten Gewicht Wasser (also wasserfreie Hefe mit etwa 10 Teilen Wasser), der langsamen Einwirkung von Toluol, Chloroform oder Essigester auszusetzen, daß unter solchen Bedingungen besonders reine Enzymlösungen entstehen. Es hat sich aber in dieser Arbeit und besonders in den gleichzeitig ausgeführten letzten Untersuchungen über Invertin (X. und XII.) gezeigt, daß die Freilegung und Auflösung der Saccharase und der Maltase und der Proteasen viel selektiver und dabei verlustlos verläuft, wenn durch den kräftigen Eingriff der Abtötung unverdünnter Hefe unter Verflüssigung und Abtrennung des Verflüssigungssaftes die Exosmose der Enzyme eingeleitet wird. Bei den ein wenig älteren Verfahren, Invertinlösungen darzustellen, geht mit der Saccharase und Maltase das halbe Gewicht der Hefe infolge autolytischer Vorgänge in Lösung. Nach unseren neuen Methoden, wobei als wesentliche Verbesserung die Fraktionierung während der Autolyse hinzukommt, werden die Enzyme quantitativ in wäßrige Lösung übergeführt zusammen mit $^1/_{20}$ bis zu $^1/_{10}$ der Hefemasse. Aus diesem Vergleich folgt, daß beim langsamen Vergiften verdünnter Hefe weitgehender enzymatischer Abbau des ganzen Hefeinhaltes stattfindet, daß sich dagegen bei energischer Abtötung der unverdünnten Hefe und darauffolgendem Verdünnen und Abtrennen des Verflüssigungssaftes vorwiegend die gesuchten Enzymkomplexe vom Zellinhalt ablösen und mit verhältnismäßig wenig Ballast in wäßrige Lösung übertreten.

Die Zusammensetzung der aus unverdünnt abgetöteter und aus verdünnter, langsam vergifteter Hefe bereiteten Enzymlösungen ist, auch abgesehen vom Reinheitsgrade, wesentlich verschieden (vgl. Abh. XII über Invertin). Die einen weisen natürliche Komplexe der Enzyme in mehr geschontem, dem ursprünglichen näher verwandten Zustande auf, während die andere Art von Lösungen, die älteren, namentlich nach den proteolytischen Vorgängen der Alterung, weitgehend verwandelte Enzymaggregate enthalten.

[268] Die Vorgänge der Freilegung einzelner Enzyme lassen sich nun klarer verfolgen und quantitativ vergleichen. Die Auflösung der Maltase und der Saccharase wird verglichen in den Versuchen der Tab. 10, die nach dem Verfahren der Hefeabtötung ausgeführt sind, teils durch Vergiftung mit Essigester, teils durch osmotische Zerstörung mittels Diammonphosphats. Es sind beispielsweise nach diesem zweiten Verfahren (Vers. 6) in 3 Stunden 95% Maltase neben 40% der Saccharase, in einem anderen Beispiel (Vers. 5) 94% Maltase zugleich mit 41% Saccharase in Lösung übergeführt worden. Nach Abtötung mit Essigester erfolgte im Vers. 3 der Tabelle die Auflösung von 78% Maltase in $8^1/_2$ Stunden, während zugleich nur 44% Saccharase in Lösung gingen.

Darstellung mit Hilfe von Essigester. Die scharf abgepreßte Hefe verrührt man mit Hilfe eines dicken Glasstabes in einer Pulverflasche mit Essigester (10 ccm auf 100 g Frischhefe) bis zur Verflüssigung, die in etwa 5 bis 10 Minuten vollständig wird. Die dünnbreiige Masse bleibt dann noch eine Zeitlang stehen, etwa $^1/_2$ Stunde, während deren Säurebildung erfolgt und wieder nachläßt. Darauf verdünnen wir mit Wasser und stellen mit verdünntem Ammoniak neutrale Reaktion auf Lackmus her. Die Analyse herausgenommener Proben zeigt die zweckmäßige Dauer der Autolyse an. Bei höchstens eintägigem Stehen gehen 95 bis 100% der Maltase in Lösung, in zu langer Versuchsdauer bei Zimmertemperatur kann die Ausbeute zurückgehen.

Um Maltaselösungen von noch höheren Reinheitsgraden zu gewinnen, empfiehlt es sich, wie für Invertin beschrieben, kurze Zeit nach dem Verdünnen mit Wasser durch Zentrifugieren die bei der Hefeverflüssigung und kurz danach ausgetretenen Stoffe abzutrennen und die wieder mit Wasser und Essigester angesetzte Hefemasse einen Tag der Autolyse zu überlassen.

Darstellung mit Hilfe von Diammonphosphat. Der Verlauf der Freilegung hängt vom Wassergehalt der Hefe ab; 21proz. Hefe ist zu feucht, scharf abgepreßte, die 25 bis 27% Trockensubstanz enthält, ist sehr geeignet. Die Gewinnung [269] der Maltase und Saccharase ist so noch einfacher, man braucht nur die Frischhefe mit 10% ihres Gewichtes an feinst gepulvertem Phosphat bis zur Verflüssigung zu verrühren und nach etwa 1 Stunde mit Wasser, dem 10fachen auf Trockenhefe berechnet, zu verdünnen, wobei das Neutralisieren wegfällt. Gewöhnlich ist die Maltase in 5 bis 8 Stunden quantitativ in Lösung übergeführt.

VI. Zunahme der Maltasewirkung in den Autolysaten.

Für Arbeiten mit Maltaselösungen ist es von entscheidendem Nutzen, daß die Lösungen dauernd bei 0° (nicht nur im Eisschrank) aufbewahrt werden. Schon in der ersten Mitteilung dieser Reihe sind merkwürdige Beobachtungen über Zunahme von Maltasewerten der Autolysate gemacht worden, aber die Aktivitätssteigerung und die Inaktivierung des Enzyms überdeckten sich. Die Maltase ist viel weniger beständig als die Saccharase. In den Autolysaten, die als Ausgangsmaterial für Invertin dienten, verschwand die Maltase beim Altern bei 30° stets schon in 1 Tag, beim Stehen bei Zimmertemperatur oft in einigen Tagen. Dagegen waren bei 0° unsere Maltaselösungen mehr als 1 Woche ganz haltbar. So läßt sich nun in allen Fällen, beginnend am 2. oder 3. Tage, bedeutende Erhöhung der Maltasewirkung beobachten, und zwar ohne eine Änderung des zeitlichen Verlaufs der Einwirkung auf Maltose.

Wie die Tab. 11 zeigt, stieg die Aktivität der Enzymlösungen von 0,0278, 0,0301 und 0,0290 scheinbaren Maltaseeinheiten auf 0,0425, 0,0488 und 0,0485 M.-[e]. an, also bis um 67 %. Diese am Invertin von uns nie beobachtete Erscheinung kommt vielleicht dadurch zustande, daß ein mit der Maltase vergesellschafteter reaktionshemmender Begleitstoff verändert oder abgeschieden wird. Diese Annahme gibt einem Einwand recht, den vor einigen Jahren A. KIESEL[1] ganz allgemein, glücklicherweise zu allgemein, gegen die quantitative Vergleichbarkeit verschiedener Objekte in bezug auf ihren Fermentgehalt geäußert hat.

[270] Tabelle 11.

Gang der Maltasewirkung in den bei 0° aufbewahrten Autolysaten.
(10 ccm Autolysat, entspr. 1 g angew Hefetrockensubstanz, auf 100 ccm Maltoselösung einwirkend.)

Autolysat Nr.	Alter	Reaktionszeit			Drehungsabnahme			Spaltung			Gehalt an Maltase	
	Tage	Minuten			°			%			M.-[e].	Aktivitätszunahme %
I	0	70,7			3,17			49,5			**0,0278**	
	3	29,0	58,3	130,0	2,36	3,15	4,40	36,9	49,3	69,0	0,0345	24,0
	6	34,7	87,0	159,2	2,74	3,86	4,68	42,8	60,4	73,0	0,0395	42,0
	9	50,0			3,28			51,3			0,0425	53,0
	12	40,0			2,87			44,8			0,0385	
II	0	59,0	104,2		2,99	3,78		46,6	59,1		**0,0294**	
	1	47,6	95,5		2,94	3,89		45,9	60,9		0,0350	19,0
	4	40,0	65,5		2,86	3,43		44,7	53,5		0,0377	28,0
	7	80,0			3,35			52,3			0,0277	
III	0	51,9			2,88			45,0			**0,0301**	
	2	40,2			3,17			49,5			0,0488	62,0
	6	7,5	20,0		1,24	2,02		19,4	31,6		0,0385	
IV	0	56,5			2,95			46,1			**0,0290**	
	2	67,0			3,22			50,2			0,0298	3,0
	3	53,0	67,8	78,6	3,28	3,65	3,90	51,3	57,0	61,0	0,0416	44,0
	4	65,7			3,80			59,3			0,0485	67,0
	7	63,0	83,7		3,21	3,65		50,1	57,0		0,0329	
	9	60,0			2,89			45,1			0,0262	
	11	37,0	70,0	115,0	2,00	2,68	3,30	31,2	41,9	51,6	0,0187	
	18	214,5			0,73			11,4			0,0006	

[1] Diese Zs. Bd. 118, S. 284 [1921/22].

Neben dem Enzymzuwachs bemerkt man in den Autolysaten, wie schon in der ersten Mitteilung erwähnt, beim Stehen die Bildung eines geringen, sehr feinen Niederschlags. Dieser vermag aber, der klaren Flüssigkeit zugesetzt, nicht etwa eine Hemmung der Maltosespaltung zu bewirken. Eine andere Möglichkeit für das Zustandekommen der Aktivitätszunahme wäre die Neubildung von Enzym aus einer Vorstufe. Mit dieser Hypothese steht indessen schlecht in Einklang, daß die Maltasemenge bei

[271] Tabelle 12. Haltbarkeit der Maltase bei verschiedenen p_H und Temperaturen.

Nr.	Maltaselösung		Aufbewahrung			
	Darstellung	M.-$[e_1]$. in 10 ccm, entspr. 1 g Trockenhefe	Bedingungen	Dauer (Stdn.)	M.-$[e_1]$. in 10 ccm	Aktivitätsverlust %
1	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	0,0189	in der Dialyse	96	0	vollständig
2	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	,,	p_H = 6,8; bei 23°	96	0	,,
3a	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	,,	,, 6,8; ,, 8°	96	0,0149	21,0
3b	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	,,	,, 6,8; ,, 8°	120	0,0142	24,8
3c	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	,,	,, 6,8; ,, 8°	144	0,0113	40,0
4	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	0,0238	,, 5,5; ,, 23°	44	0	vollständig
5a	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	,,	,, 6,3; ,, 23°	44	0,00266	88,8
5b	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	,,	,, 6,3; ,, 23°	64	0	vollständig
6a	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	,,	,, 6,8; ,, 23°	44	0,0160	32,8
6b	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	,,	,, 6,8; ,, 23°	64	0,0116	51,2
7a	mit Essigester bei 23°, gebrochen	0,0118	,, 7,5; ,, 23°	48	0,00725	38,5
7b	mit Essigester bei 23°, gebrochen	,,	,, 7,5; ,, 23°	100	0,00107	90,5
8	mit Essigester bei 23°, ungebrochen	0,0238	,, 8,3; ,, 23°	44	0	vollständig
9	mit Diammonphosphat bei 23°, ungebrochen	0,0264	,, 6,8; ,, 1°	24	0,0264	0
10	mit Diammonphosphat bei 23°, ungebrochen	0,0259	,, 4,5; ,, 1°	2½	0,0242	6,0
11	mit Diammonphosphat bei 23°, ungebrochen	,,	,, 8,3; ,, 1°	2½	0,0241	7,0

der Auflösung aus der Hefe [272] anscheinend konstant bleibt und daß die Hefe unter Bedingungen sehr reichlicher Saccharasebildung, nämlich bei Gärführung mit niedriger Zuckerkonzentration, in nur geringem Maße ihren Maltasegehalt vermehrt.

Aus der Tabelle ist ferner zu ersehen, daß nach Verlauf von etwa 8 Tagen die Maltasewirkung zu sinken beginnt. Auch dabei tritt keine Änderung der Kinetik ein.

Dieser Gang der Aktivität ist an Maltaselösungen bei dem günstigen p_H beobachtet worden. Wie schon L. MICHAELIS und P. RONA[1] gefunden haben, ist die Maltase in sauerer und alkalischer Lösung viel leichter zersetzlich (vgl. die Tab. 12). Für die Isolierung des Enzyms ist es jedoch wichtig, die Tonerdeadsorbate, die Gemische von Maltase und Saccharase enthalten, zur Elution mit saueren und alkalischen Mitteln, nämlich mit primärem und sekundärem Phosphat zu behandeln. Wenn man bei einer Temperatur von wenig über 0° arbeitet, dann wird, wie aus den Versuchen 10 und 11 der Tab. 12 ersichtlich, sowohl ein p_H von 4,5 wie von 8,3 einige Stunden lang mit Verlusten von nur etwa 7% ertragen. Durch Erniedrigung der Temperatur auf 0° und Abkürzung der Operationen läßt sich auch dieser Verlust vermeiden.

[1] Biochem. Zs. Bd. 57, S. 70 [1913], und zwar S. 77.

Zeitschrift für physiologische Chemie 151, S. 273 [1926].

66. TRENNUNG VON MALTASE UND SACCHARASE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und EUGEN BAMANN.

Siebente Mitteilung über Maltase.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. Oktober 1925.)

Einleitung.

Es ist die Aufgabe dieser Arbeit, die Adsorptionsmethode für die Fraktionierung von Enzymgemischen weiter zu entwickeln. Das erste von uns untersuchte Beispiel[1] der Trennung von Enzymen betraf das Gemisch von drei Pankreasenzymen, die auf so verschiedene Substrate wie Fette, Proteine und Stärke eingestellt sind. Es gelang mit Hilfe von Tonerde, die Lipase, wie es schien, auf Grund ihrer mehr ausgeprägten sauren Eigenschaften, von Trypsin und Amylase zu trennen, während sich Trypsin, anscheinend gemäß seiner basischen Eigenschaften, von der Amylase scheiden ließ. Die einander viel näherstehenden biosenspaltenden Enzyme werden geringere Unterschiede im Adsorptionsverhalten zeigen. Man wird feinere Methoden aufsuchen müssen, um ihre bei der vorsichtigen Autolyse der Hefe entstehenden Gemische zu fraktionieren. Ähnliche Aufgaben stellt die Untersuchung der proteolytischen Enzyme. E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. HARTENECK lösen in einer demnächst erscheinenden Arbeit das Gemisch der [274] pankreatischen Proteasen, Trypsin und Erepsin, in die Komponenten auf und auf andere Weise trennen in einer zu veröffentlichenden Untersuchung R. WILLSTÄTTER und W. GRASSMANN die Hefeproteasen, ebenfalls tryptisches und ereptisches Enzym.

Die experimentelle Methode eilt der theoretischen Erklärung voraus. Die auf L. MICHAELIS[1]) zurückgehende einfache Anschauung, nach der die Adsorbentien vermöge ihrer sauren oder basischen Eigenschaften auf die Enzyme oder richtiger auf die Enzymkomplexe von entgegengesetzter elektrochemischer Natur wirken sollen, ist, wie sich im folgenden zeigen wird, nicht mehr genügend, die beobachteten Unterschiede zu erklären. In dem Aluminiumhydroxyd von der Formel AlO_2H, das weder mit 38proz. Salzsäure noch mit 4proz. Natronlauge merklich zu reagieren vermag,

[1] R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ, Diese Zs. Bd. 125, S. 132 [1922/23] (*Abh. 89*).

[1]) Biochem. Zs. Bd. 7, S. 488 [1907/08]; L. MICHAELIS und M. EHRENREICH, Biochem. Zs. Bd. 10, S. 283 [1908].

finden wir ein so ausgeprochen selektives Adsorbens, daß nicht die saueren oder basischen Eigenschaften dieser Tonerde, sondern noch nicht genau definierte Affinitätsverhältnisse für die Adsorptionswirkungen bestimmend sein müssen.

Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten über die Isolierung von Enzymen und zu ihrer Unterstützung haben wir eine Reihe von Hydrogelen zu untersuchen begonnen. Unterschiede der chemischen Konstitution und des Reaktionsverhaltens sollten beispielsweise in den Aluminiumhydroxyden aufgesucht und der Adsorptionsmethode dienstbar gemacht werden. Diese Absicht wird durch die Darstellung einer größeren Reihe von Tonerde-gelen gefördert, die R. WILLSTÄTTER, H. KRAUT und O. ERBACHER demnächst in einer siebenten Arbeit* „Über Hydrate und Hydrogele" beschreiben werden. Das frisch gefällte, so rasch als möglich ausgewaschene Hydrogel $Al(OH)_3$ und dasselbe nach eintägigem oder mehrtägigem Altern wird genauer unterschieden von dem für Adsorptionszwecke gewöhnlich verwendeten länger gealterten Tonerdegel. Zu diesen Sorten kommt ein bei 250° durch [275] Einwirkung von Ammoniak auf $Al(OH)_3$ gewonnenes Tonerdegel von der Formel AlO_2H, das sich als ein sehr nützliches Adsorbens erweist.

Das kurz gealterte Tonerdegel $Al(OH)_3$ ist in seiner auswählenden Adsorptionswirkung auf Gemische von Maltase und Saccharase dem ganz frischen Gel weit überlegen und es wird seinerseits erheblich übertroffen vom Gel der Formel AlO_2H. Die neuen Hydrogele vermögen zum Unterschied von den gewöhnlichen Tonerdesorten die Maltase reichlich, aber die Saccharase nur spärlich aus den Autolysaten zu adsorsieren. Manche Hefeautolysate liefern so schon in einem Vorgang Adsorbate und daraus mit Diammonphosphat Elutionen von enzymatisch einheitlicher Maltase, während zugleich die Lösungen der Saccharase mit geringem Verlust von ihrem Gehalt an Maltase befreit werden.

Die auswählende Adsorption wird ergänzt durch eine Methode der auswählenden Elution aus den Enzymadsorbaten. Aus den Tonerdeadsorbaten werden Maltase wie Saccharase durch schwach alkalisches Phosphat eluiert, auch noch durch Phosphatmischung von $p_H = 6{,}8$, aber von primärem Alkaliphosphat wird die Saccharase fast allein eluiert und zwar vollständig, während der größte Teil der Maltase enzymatisch einheitlich im Adsorbat zurückbleibt und daraus gewonnen werden kann.

Für die Kenntnis der Adsorbentien ergibt sich aus diesen Beobachtungen, daß sie auf Grund der Adsorptionsversuche mit einzelnen Enzymen unvollständig oder unrichtig beschrieben werden. Man prüfte z. B. ein Tonerdegel mit Invertin, mit Lipase oder mit Amylase usw. So wäre das Gel AlO_2H nach seinem Verhalten gegen Invertin und andere Enzyme als ein unbrauchbares Adsorbens zu bezeichnen. Eine genauere Kenntnis gewährt die Prüfung mit Enzymgemischen, wie den Hefecarbohydrasen, den beiden Pankreasproteasen oder den beiden Hefeproteasen. Man gewinnt für die Adsorptionsmethode bessere Reagentien, für die Erklärung der Adsorptionserscheinungen vollkommeneres Beobachtungsmaterial.

* *Abh. 22.*

[276]

Experimenteller Teil.

Vergleich des Adsorptionsverhaltens von Maltase und Saccharase.

Das Material für die Adsorptionsversuche bestand in zwei Arten von Gemischen der Maltase und Saccharase. Die Enzymlösungen aus gewöhnlicher Bierhefe enthielten auf 1 M.-[e]. nach beendeter Freilegung beider Enzyme etwa das 18fache an Saccharase, mit analogem Maße, also Vergleichseinheiten, gemessen. In einem Autolysat aus der durch Gärführung bei niedriger Zuckerkonzentration gewonnenen invertinreichen Hefe trafen hingegen auf 1 M.-[e]. 666 S.V.E. Die Autolyse wurde nach vollständiger Freilegung des Invertins, nach 30 Stunden, abgebrochen.

1. Enzymlösungen aus 100 g Hefetrockensubst. enth. 2,78 M.-[e]. und 53,5 S.V.E.; 2,04 M.-[e]. und 66,0 S.V.E.; 3,01 M.-[e]. und 51,9 S.V.E.; 2,90 M.-[e]. und 31,6 S.V.E.
2. Enzymlösung aus 100 g invertinreich gemachter Trockenhefe v. Inv.-Zeitw. 17,4 enth. 1,44 M.-[e]. und 960 S.V.E.

Die Maltase enthaltenden Lösungen waren ununterbrochen auf 0° gehalten und alle Operationen, wie Adsorption, Trennung von Restlösung und Adsorbat in einer rasch auslaufenden Zentrifuge, Auswaschen des Adsorbates und Untersuchung der Restlösung sind so genau wie möglich bei 0° ausgeführt worden.

Unter den angewandten Adsorbentien sind drei neue einer demnächst zu veröffentlichenden Untersuchung von WILLSTÄTTER, KRAUT und ERBACHER entnommen:

1. Tonerdegel $Al(OH)_3$, aufs rascheste dargestellt, so daß das Auswaschen in der Zentrifuge in 2 Stunden nach der Fällung beendet war; die Verwendung geschah 3 bis höchstens 4 Stunden nach Beginn der Ausfällung.
2. Dasselbe nach Alterung von einem Tag oder einigen Tagen.
3. Tonerdegel AlO_2H.

Die Mehrzahl der quantitativen Analysen, die den Angaben über Adsorptionsverhalten und über Trennung der Enzyme zugrunde liegen, haben infolge der Veränderlichkeit der Reaktionskinetik nur die Bedeutung von Schätzungen oder von qualitativen Beobachtungen. Die Maltasemengen M.-[e_1]. [277] der Ausgangslösungen, die stets der 1. Zeit-Umsatzkurve der sechsten Mitteilung (Abb. 4) folgten, und die Maltasemengen M.-[e_2]. der aus den Adsorbaten gewonnenen Elutionen, deren Kinetik der 2. Kurve (Abb. 6 der sechsten Mitteilung) zu folgen pflegte, sind nicht ohne weiteres vergleichbar. Noch weniger geeignet für Mengenvergleich sind die Maltasewirkungen der meisten Adsorptionsrestlösungen und Adsorbate, weil diese die Maltosespaltung mit von Fall zu Fall verschiedenem zeitlichem Verlauf bewirkten. Genaue quantitative Angaben sind daher im allgemeinen nur dann zu verzeichnen, wenn es sich um das Vorhandensein von 100 oder 0% Maltase handelte. Immerhin ist auch da, wo aus der Wirkung nicht auf Mengen des Enzyms geschlossen werden darf, das Adsorptionsverhalten des Enzymgemisches gegen verschiedene Adsorbentien genügend vergleichbar, da die Maltosespaltung in etwa demselben Bereiche zwischen 15 und 30% Hydrolyse mit gleichen Mengen der Adsorptionsrestlösungen ermittelt wurde; die Invertinbestimmung begegnete keiner Schwierigkeit.

Kaolin. L. MICHAELIS und P. RONA[1] haben schon in ihren Untersuchungen über die Wirkungsbedingungen der Maltase beobachtet, daß im Gegensatz zum Invertin die Maltase durch Kaolin sehr merklich adsorbiert werde. Nach unseren Versuchen (Tab. 1) mit vollständig ausgewaschenem salzsäurebehandeltem Kaolin wird aus den Autolysaten, deren großer Hefegummigehalt die Adsorption stört, Maltase viel reichlicher als Saccharase adsorbiert, z. B. schätzungsweise mehr als $^9/_{10}$ von ersterer zugleich mit $^3/_{10}$ der letzteren. Wurden die Adsorbate sofort bei 0° untersucht, so fanden sich darin in einem Falle noch etwa 14, in einem anderen etwa 20 % der adsorbierten Maltasemenge. Diese Zerstörung der Maltase im Kaolinadsorbate hatten schon WILLSTÄTTER, OPPENHEIMER und STEIBELT[2] beobachtet. In den verschiedenen Tonerdeadsorbaten ist dagegen die Haltbarkeit des Enzyms bemerkenswert.

[278]

Tabelle 1.

Kaolinadsorption von Maltase und Saccharase aus Gemischen.

(Die Bestimmungen wurden mit 100 ccm Maltoselösung ausgeführt.)

Nr.	Autolysat	Enzymmenge in angew. 10 ccm		Reaktion der Lösung	Angew. Adsorbens	Bestimmung der Restlösung				Adsorbierte Maltase schätzungsweise	Adsorbierte Saccharase
		M.-[e_1].	S.V.E.			Angew.	Reaktionszeit	Drehungsabnahme	Spaltung		
					g	ccm	Min.	°	%		%
1	II	0,0335	0,6600	neutr.	9,12	40 v. 56,2	65,0	1,00	15,6	$^9/_{10}$	12,0
2	IV	0,0290	0,3160	,,	1,00	20 ,, 35	160,0	3,50	54,6	$<{}^1/_{20}$	0,8
3	IV	0,0290	0,3160	,,	1,52	20 ,, 35	97,0	2,80	43,8	$^1/_{10}$	6,6
4	IV	0,0290	0,3160	,,	13,80	40 ,, 78	78,5	0,45	7,0	nahezu ganz	29,4
5	IV	0,0292	0,3160	$^n/_{20}$-essigs.	6,90	20 ,, 122	165,8	0,01	—	vollst.	28,3

Tonerde. Alle Gele von Aluminiumhydroxyd adsorbieren verhältnismäßig mehr Maltase als Saccharase. Am wenigsten geeignet für eine Trennung war eines der üblichen Präparate von lange gealtertem Aluminiumhydroxyd *C*. Dieses nahm aus zwei Autolysaten (Vers. 2 und 11 der Tab. 2) schätzungsweise neben $^2/_3$ bis $^4/_5$ der Maltase 7 bis 12 % der Saccharase auf. Die Enzymlösungen verhielten sich übrigens sehr ungleich; bei den Autolysaten I und II waren alle Unterschiede zwischen beiden Enzymen größer als bei IV.

Das Verhalten der vier verschiedenen Tonerdegele ist nach den Versuchen der Tab. 2 so abgestuft, daß die Bevorzugung der Maltase ansteigt von lange gealterter Tonerde *C* zum frisch dargestellten Gel $Al(OH)_3$, weiter zum nämlichen aber kurz gealterten Gel und noch mehr zum Gel von der Formel AlO_2H. Der Adsorptionswert dieses Tonerdegels für Maltase beträgt nur etwa $^1/_5$ von dem der gewöhnlichen Tonerde *C*, aber Invertin wird von AlO_2H aus den Autolysaten mit mindestens 25 mal schlechterem Adsorptionswert aufgenommen, als von gewöhnlicher Tonerde.

Das Gel AlO_2H wurde mit Invertin allein geprüft.

[1] Biochem. Zs. Bd. 57, S. 70 [1913], und zwar S. 82.
[2] Diese Zs. Bd. 110, S. 232 [1920], und zwar S. 240.

[279] Hydrogel AlO_2H:
Ads. von Invertin (durch Kaolin gereinigt, S.W. 2,5). Angew. 0,10 S.E. in 5 ccm, 0,032 und 0,059 g Adsorbens, 13 und 19% adsorbiert, A.W. 0,37 und 0,32.
Aus derselben Enzymlösung ads. ein Präparat von Tonerde *C* bei gleichen Adsorptionsgraden mit A.W. 44 bis 32.
Adsorption von reinerem Invertin (S.W. 5,3).
Angew. 0,02 S.E. in 10 ccm, 0,179 g Adsorbens, 33% adsorbiert, A.W. nur 0,038.

Nach diesen ungemein niedrigen Adsorptionswerten würde dieses Tonerdegel als ein sehr schlechtes Adsorbens anzusprechen sein. Das wäre nicht überraschend, da seine Bildung bei 250° erfolgt. Der angeführte Vergleich (Vers. 6 und 10 der Tab. 2) zeigt aber, daß es ein durch selektive Wirkung ausgezeichnetes Adsorbens ist.

Vergleichende Versuche mit einigen anderen Metallhydroxyden (Tab. 3) boten keinen Vorteil gegenüber Tonerde. α-Zinnsäure, ein gealtertes Präparat, das keine Folgerung auf die Adsorptionseigenschaften der verschiedenen Stannihydroxyde erlaubt, zeigt keine auswählende Adsorption. Zinkhydroxyd adsorbiert die Maltase etwas günstiger selektiv als alte Tonerde *C*; sowohl Maltase als Saccharase verderben sofort an diesem Adsorbate. Ferrihydroxyd, ein altes Präparat, war viel geeigneter als alte Tonerde *C*, ebenso günstig wie frisch gefällte Tonerde.

Trennung von Maltase und Saccharase durch auswählende Adsorption.

Befreiung der Saccharase von der Maltase.

Die Invertinlösungen werden mit Hilfe derjenigen Aluminiumhydroxyde, die bei der Adsorption Maltase vorziehen, vollständig von Maltase befreit, ohne daß sich das Produkt ihrer Inaktivierung der Saccharase beimischt. Das geeignetste Ausgangsmaterial ist natürlich die Enzymlösung aus invertinreicher Hefe, in der auf 1 M.-[e_1]. etwa 15- bis 30mal mehr Saccharase trifft als in gewöhnlichen Hefeautolysaten.

Beispiel: 10 ccm Autolysat aus Hefe vom Invertinzeitwert 17,4 (aus 1,0 g Hefetrockensubstanz dargestellt) enthielten 0,0144 M.-[e_1]. neben 9,6 S.V.E. In die kalte Enzymlösung [282] trugen wir die ebenfalls auf 0° gekühlte Suspension des kurz gealterten Tonerdegels (entspr. 0,20 g Al_2O_3) ein und trennten nach Durchschütteln durch Zentrifugieren die Restlösung vom Adsorbat ab, das einmal mit Eiswasser in der Zentrifuge ausgewaschen wurde. Von dieser Restlösung (40,0 ccm) bewirkten 10 ccm in $4^1/_2$ Stunden nur eine Drehungsabnahme der Maltose von 0,13° (geschätzter Gehalt nur 0,00002 M.-[e_1].), sie war also so gut wie frei von Maltase. Ihr Gehalt an Saccharase belief sich noch auf 7,86 S.V.E., also 81,9% der angewandten Menge.

Bei der Wiederholung des Versuches erfolgte die Adsorption mit demselben Tonerdegel in zwei Anteilen. Zuerst entfernte das Hydroxyd entsprechend 0,10 g Al_2O_3 mit nur 2,6% der Saccharase schätzungsweise etwas mehr als $^3/_4$ der Maltase, in einem zweiten Male das Gel entsprechend 0,059 g Al_2O_3 den ganzen Rest der Maltase mit noch 15,0% der Saccharase.

[280] Tabelle 2. Adsorption von Maltase und Saccharase durch verschiedene

Nr.	Autolysat	Enzymmenge in angew. 10 ccm		Reaktion	Adsorbens
		M.-[e₁].	S.V.E.		
1	I	0,0416	0,5350	neutral	Tonerde *C*
2	I	0,0426	0,5350	dgl.	dgl.
3	I	0,0385	0,5350	dgl.	kurz gealterte Tonerde
4	I	0,0416	0,5350	dgl	Tonerdegel v. d. F. AlO_2H
5	I	0,0426	0,5359	dgl.	dgl.
6	I	0,0426	0,5350	dgl.	dgl.
7	II	0,0380	0,6600	dgl.	Tonerde *C*
8	II	0,0338	0,6600	u. Zus. v. 0,1 g Phosph. $p_H = 6,8$	dgl.
9	II	0,0377	0,6600	neutral	kurz gealterte Tonerde
10	II	0,0377	0,6600	dgl.	Tonerdegel v. d. F. AlO_2H
11	III	0,0490	0,5190	dgl.	Tonerde *C*
12	III	0,0490	0,5190	u. Zus. v. 0,1 g KH_2PO_4	dgl.
13	III	0,0490	0,5190	neutral	kurz gealterte Tonerde
14	IV	0,0299	0,3160	dgl.	Tonerde *C*
15	IV	0,0299	0,3160	dgl.	dgl.
16	IV (8 Tage gealtert)	0,0262	0,3160	dgl.	dgl.
17	IV	0,0299	0,3160	n/20 -essigsauer	dgl.
18	IV	0,0299	0,3160	dgl.	dgl.
19	IV	0,0299	0,3160	schwach ammoniakalisch	dgl.
20	IV	0,0329	0,3160	neutral	frisch gefällte Tonerde
21	IV	0,0329	0,3160	dgl.	dgl.
22	IV	0,0329	0,3160	dgl.	dgl.
23	IV	0,0262	0,3160	dgl.	kurz gealterte Tonerde
24	IV	0,0222	0,3160	dgl.	dgl.
25	IV	0,0329	0,3160	dgl.	Tonerdegel v. d. F. AlO_2H
26	IV	0,0311	0,3160	dgl.	dgl.
27	IV	0,0189	0,3160	dgl.	dgl.
28	V	0,0144	9,6000	dgl.	kurz gealterte Tonerde
29	V	0,0144	9,6000	dgl.	dgl.

Tabelle 3. Adsorption von Maltase und Saccharase durch einige

1	IV	0,0485	0,3160	neutral	α-Zinnsäure
2	IV	0,0262	0,3160	dgl.	Zinkhydroxyd
3	IV	0,0188	0,3160	dgl.	dgl.
4	IV	0,0188	0,3160	dgl.	dgl.
5	IV	0,0419	0,3160	dgl.	Eisenhydroxyd

Befreiung der Maltase von Saccharase.

Die Abtrennung der Saccharase aus dem Hefeautolysat II wurde mit dem Gel von der Formel AlO_2H ausgeführt, indem wir auf 10 ccm Autolysat die Tonerde entsprechend 0,64 g Al_2O_3 einwirken ließen. Das mit Wasser von 0° ausgewaschene Adsorbat enthielt so wenig Saccharase, daß $^1/_3$ davon bei der Bestimmung in 115 Minuten nur 0,20° Drehungsabnahme entsprechend 2,9% Spaltung, bewirkte; wäre 1% der Saccharase adsorbiert worden, so hätte die Drehungsabnahme 0,22° entsprechend 3,2% Spaltung betragen. Die Restlösung enthielt noch ungefähr $^1/_3$ der angewandten Maltase, die Hauptmenge wurde im Tonerdeadsorbat nachgewiesen; $^2/_3$ desselben bewirkten in 58 Minuten 1,92° Drehungsabnahme, entsprechend 30% Maltosespaltung.

[281] Aluminiumhydroxyde. (Die Bestimmungen wurden mit 100 ccm Maltoselös. ausgeführt.)

Angewandte Menge g	Maltasebestimmung mit der Restlösung: Angewandte ccm	Reakt.-Zeit Min.	Drehungs-abnahme °	Spaltung %	Adsorbierte Maltase schätzungsweise	Adsorbierte Saccharase %
0,1040 Al_2O_3	20 von 30	38,5	1,63	25,5	> 1/2	4,5
0,1560 ,,	20 ,, 33	72	1,70	26,6	7/10	7,0
0,0995 ,,	20 ,, 31	71,5	1,65	25,8	7/10	0,3
0,3200 ,,	20 ,, 40	56 77	2,20 2,58	34,4 40,4	1/4	0
0,6400 ,,	10 ,, 33	80	1,40	21,8	> 6/10	0
1,2800 ,,	10 ,, 50	112	1,00	15,6	8/10	0
0,1560 ,,	20 ,, 33	52,8	1,37 1,80	21,4 28,2	7/10	7,8
0,1560 ,,	20 ,, 37,5	57,5	1,80	28,2	4/10	4,5
0,0955 ,,	20 ,, 31,5	67,7	1,73	27,1	7/10	0,5
0,6400 ,,	10 ,, 37	110	1,50	23,4	> 6/10	0
0,1560 ,,	20 ,, 30	57,6	1,39	21,7	8/10	12,5
0,1560 ,,	20 ,, 31	49,5	2,02	31,6	1/2	7,0
0,1500 ,,	20 ,, 35	60	0,95	14,8	9/10	4,8
0,0467 ,,	10 ,, 15	62	2,46	38,4	1/10	12,9
0,1600 ,,	20 ,, 35	60 103	0,92 1,08	14,4 16,0	> 8/10	32,5
0,0800 ,,	20 ,, 26,5	63,8	1,55	24,2	2/3	27,2
0,0234 ,,	20 ,, 25	91	2,80	43,7	1/3	13,2
0,0938 ,,	20 ,, 35,5	73,7	1,20 1,45	18,8 22,6	> 8/10	35,8
0,1600 ,,	30 ,, 45,5	106,3	1,90	29,6	7/10	23,8
0,0661 ,,	15 ,, 25	57,5	1,81	28,3	1/2	2,6
0,1322 ,,	20 ,, 31	65,5	1,08	16,9	8/10	0,8
0,1990 ,,	20 ,, 35	158,5	1,00	15,6	> 9/10	50,2
0,0661 ,,	20 ,, 26	45 80,8	1,50 1,80	23,4 28,2	> 1/2	1,3
0,0995 ,,	20 ,, 32	76	0,85	13,3	> 8/10	6,0
0,1600 ,,	20 ,, 40	69,8	2,05	32,1	1/3	2,1
0,3200 ,,	20 ,, 48	80,5	1,44	22,5	6/10	2,6
0,4800 ,,	10 ,, 33,5	148	0,80	12,5	8/10	3,7
0,2000 ,,	10 ,, 40	94,5 270	0,05 0,13	0,7 2,0	vollständig	18,1
0,1000 ,,	10 ,, 35	75	0,48	7,5	8/10	2,6 } I. Ads.
0,0590 ,,	20 ,, 50	55	0,01	0,1	vollständig	15,0 } II. Ads.

Metallhydroxyde. (Die Bestimmungen wurden mit 100 ccm Maltoselösung ausgeführt.)

0,32 SnO_2	20 von 30	91	2,80	43,8	1/2	45,4
0,12 ZnO	20 ,, 27	64,3	2,50	39,1	1/10	3,4
0,36 ,,	20 ,, 38	61	0,95	14,8	7/10	13,7
0,96 ,,	40 ,, 65	55,2	0	0	vollständig	61,0
0,32 Fe_2O_3	20 ,, 46	79,1	1,30	20,3	8/10	8,2

Bei der Wiederholung mit demselben Tonerdegel und dem Autolysat I (0,0416 M.-[e_1].) adsorbierten wir die Maltase in drei Anteilen, das erste Adsorbat (0,32 g Al_2O_3) sollte nach der Analyse der Restlösung, die noch genau dem ersten Zeit-Umsatz-Gesetze folgte, 25 % der Maltase enthalten. Die daraus mit 26 ccm 1 % Diammonphosphat bei 0° gewonnene Elution [283] folgte der zweiten Kinetik und ergab den Gehalt von 0,009 M.-[e_2].

20 von 40 ccm Restlösung bewirkten in 56 bzw. 77 Minuten 2,20 bzw. 2,58° Drehungsabn., entspr. 34,4 bzw. 40,4 % Maltosespaltung; ber. 0,0312 M.-[e_1].

20 von 26 ccm Elution bewirkten in 49,5 Minuten 1,60° Drehungsabn., entspr. 25 % Maltosespaltung; ber. 0,009 M.-[e_2].

In dem zweiten Adsorptionsversuch mit der doppelten Menge Aluminiumhydroxyd enthielt die Restlösung anscheinend noch 1/3, in dem dritten mit 1,28 g Al_2O_3 noch

$^1/_5$ der angewandten Maltase. Auch diese drei Adsorbate enthielten neben der Maltase keine Saccharase oder nur Spuren. Auch nach der Adsorption mit der größten Tonerdemenge zeigte die Restlösung noch unverminderte Invertinwirkung. Vom dritten Adsorbate bewirkte $^1/_3$ in 84 Minuten Drehungsabnahme der Rohrzuckerlösung von 0,17°, entsprechend 2,5% Spaltung. In einer Reihe von Versuchen, die schon in der Tab. 2 berücksichtigt sind (Nr. 3, 9 und 13), geschah die Trennung der beiden Enzyme durch Adsorption mit wenige Tage gealtertem Aluminiumhydroxyd. In zwei Beispielen trafen in den Adsorbaten auf schätzungsweise $^2/_3$ der angewandten Maltase 0,3 bis 0,5% der angewandten Saccharase, nämlich 0,0016 und 0,0033 S.V.E. Im dritten Versuch wurde der größte Teil der Maltase adsorbiert zusammen mit 0,025 S.V.E., d. i. gegen 5%. In diesen Fällen läßt sich die Enzymtrennung vervollständigen durch die im nächsten Abschnitt beschriebene fraktionierte Elution.

Trennung von Maltase und Saccharase durch auswählende Elution.

Beide Enzyme werden aus den Adsorbaten etwa gleichmäßig (Tab. 4) durch Phosphatgemisch von $p_H = 6,8$ eluiert, indessen weniger leicht als durch Diammonphosphat, so daß mehr Eluens und längere Zeit erforderlich ist. Die Elution wird zur Schonung der Maltase bei 0° vorgenommen, sie verläuft bei dieser Temperatur viel langsamer als bei gewöhnlicher. Einen großen Unterschied ergibt die Anwendung von [284] primärem Phosphat. Wie die Versuche Nr. 2b und 3b der Tab. 4 erweisen, läßt sich dadurch die Saccharase auch bei 0° eluieren, während die Hauptmenge der Maltase im Adsorbat zurückbleibt, so daß sie nachher durch Diammonphosphat frei von Saccharase eluiert werden kann.

Mit den für die Elutionsversuche angewandten Enzymmengen M.-[e₁]. sind die aus den Adsorbaten eluierten Mengen nur einigermaßen annähernd vergleichbar, da die Maltaseelutionen der zweiten Kinetik (Abb. 6 der sechsten Mitteilung) zu folgen

Tabelle 4. Elution von Saccharase und Maltase aus Tonerdeadsorbaten.
(Die Bestimmungen wurden mit 100 ccm Maltoselösung ausgeführt.)

Nr.	Geh. der angew. Adsorb. an		Elution	Maltasebest. mit der Elution				Eluiert		
	M.-[e_1]	S.V.E.		Angew. ccm	Reakt.-Zeit Min.	Dreh.-Abn. °	Spaltung %	Maltase: in M.-[e_2]	Maltase: im Verh. zur ang. Menge ungefähr	Saccharase: in Proz. d. angew. Menge
1a	0,0156	0,3120	0,5 g Phosph. $p_H = 6,8$; ½ Std.	20 v. 25,5	71,9	1,80	28,1	0,00775	ca. ¾	69,6
1b	0,0156	0,3120	1,0 g Phosph. $p_H = 6,8$; ½ Std.	20 „ 33,5	70,0	1,80	28,1	0,0104	fast vollst.	72,2
1c	0,0156	0,3120	0,5 g Phosph. $p_H = 6,8$; 3 Std.	20 „ 26,5	51,1	1,77	27,7	0,0108	fast vollst.	75,5
2a	0,0104	0,2130	2,0 g Phosph. $p_H = 6,8$; 4 Std.	20 „ 32,5	48,5	1,65	25,7	0,0122	vollst.	83,8
2b	0,0104	0,2130	0,3 g KH_2PO_4; 1 Std.	20 „ 26,0	57,2	0,45	7,0	0,000613	< $^1/_{10}$	80,5
3a	0,0111	0,2300	0,5 g $(NH_4)_2HPO_4$; 50 Min.	20 „ 30,0	51	1,84	28,7	0,0135	vollst.	77,0
3b	0,0111	0,2300	0,5 g KH_2PO_4; 50 Min.	20 „ 30,0	51	0,32	0,5	0,000613	< $^1/_{10}$	77,0

pflegten. Das Mengenverhältnis von M.-[e_1]. und M.-[e_2]., nämlich 1 M.-[e_1]. = 0,685 M.-[e_2]., läßt sich nach dem in der Abb. 5 der vorigen Mitteilung dargestellten Vergleiche zwischen beiden Zeit-Umsatz-Beziehungen schätzen.

[285] Beispiel mit invertinreichem Adsorbat.

Mit Tonerde *C* (0,1665 g Al_2O_3) wurde durch vollständige Adsorption der Maltase und annähernd vollständige der Saccharase ein Adsorbat dargestellt, das 0,230 S.V.E. und etwa 0,0111 M.-[e_1]. enthielt. Zu zweimaliger Elution dienten je 0,5 g Kaliummonophosphat. Die erste Elution (50 Minuten bei 0°) enthielt 0,177 S.V.E., also 77%, die zweite (3 Stunden bei 0°) 0,0394 S.V.E., also 17,1% Saccharase. An Maltase wiesen die beiden Elutionen nur 0,000613 und 0,00023 [e_2]. auf. Zum dritten Male wurde die Tonerde, wieder bei 0°, 30 Minuten lang mit 0,5 g Diammonphosphat behandelt. Die gewonnene Elution enthielt keine bestimmbare Invertinmenge, dagegen 0,00605 M.-[e_2]., d. i. nach der oben angegebenen Mengenbeziehung zwischen [e_1]. und [e_2]. reichlich $^3/_4$ des angewandten Enzyms.

Beispiel mit invertinarmem Adsorbat.

Die beschriebene Trennung läßt sich dadurch erleichtern, daß man durch Anwendung einer mehr auswählend adsorbierenden Tonerdesorte, nämlich kurz gealterter Tonerde, ein Adsorbat als Ausgangsmaterial benützt, das neben ungefähr 0,0430 M.-[e_1]. nur wenig Invertin, und zwar 0,0208 S.V.E. enthält. In einmaliger Elution während $1^1/_4$ Stunden bei 0° durch 0,5 g primäres Phosphat wurde der Tonerde die ganze Menge Saccharase entzogen (gef. in der Elution 0,0210 S.V.E.), von nur 0,00067 M.-[e_2]. begleitet. Darauffolgende Einwirkung von 0,5 g Diammonphosphat bei 0° während 30 Minuten lieferte eine Elution, worin sich 0,0529 M.-[e_2]., d. i. scheinbar mehr als 100% der angewandten Menge befanden.

Um die auswählende Elution umgekehrt zur Befreiung der Saccharase von Maltase anzuwenden, bieten die Autolysate aus invertinreicher Hefe das beste Ausgangsmaterial. Die mit gewöhnlicher Tonerde daraus gewonnenen Adsorbate enthalten Saccharase und Maltase in einem für die Elution der reinen Saccharase mit primärem Phosphat sehr günstigen Verhältnis.

Zeitschrift für physiologische Chemie 152, S. 202 [1926].

67. ÜBER DIREKTE MALTOSEGÄRUNG DURCH MALTASEREICHE HEFE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und EUGEN BAMANN.

Achte Mitteilung über Maltase.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 2. Dezember 1925.)

Einleitung.

Die Methode der Versuche von R. WILLSTÄTTER und CH. D. LOWRY[1] über direkte Vergärung von Rohrzucker besteht in der Herabsetzung des Invertingehaltes der Hefe durch chemische Eingriffe und im Vergleich der Gärung und Spaltung mit invertinärmsten Hefen bei stark saurer Reaktion. Bei $p_H = 2$ wird die Gärgeschwindigkeit auf $^2/_3$ bis $^1/_2$, die Invertinwirkung aber z. B. auf $^1/_{10}$ herabgesetzt. Für die Methode, den Verlauf der Gärung und Spaltung einer Biose in saurer Lösung zu vergleichen, ist die Maltose ein geeigneteres Substrat. Die Erscheinung ist in diesem Fall viel schöner als beim Rohrzucker. Denn eben in schwach saurer Lösung, in der Saccharase optimal wirkt, nämlich bei $p_H =$ etwa 4,5, ist die Maltase, deren Reaktionsoptimum in der Nähe des Neutralpunktes liegt, schon vollkommen ausgeschaltet. Während unter diesen Verhältnissen Hefen und Maltaselösungen keine hydrolysierende Wirkung auf Malzzucker ausüben, erfolgt die Gärung mit voller Geschwindigkeit. Es zeigt sich sogar in [203] Übereinstimmung mit einer vor kurzem erschienenen Untersuchung von E. HÄGGLUND und A. M. AUGUSTSON[1]), daß die Gärung der Maltose bei saurer Reaktion und zwar in einem engen Bereich um $p_H =$ etwa 5 mit der größten Geschwindigkeit stattfindet. Wenn bei dieser Acidität 50 % Maltose unter den Versuchsbedingungen von WILLSTÄTTER und STEIBELT[2]) vergoren sind, so erreicht im Vergleichsversuche bei $p_H = 6{,}4$ die Gärung nur beispielsweise 32,5 %. Für die maltasereichen Hefen bedeutet also die Einstellung der günstigsten ($p_H = 4{,}5$) Gärbedingungen für Malzzucker zugleich die vollständige Ausschaltung des biosespaltenden Enzyms.

[1] XI. Abhandlung über Invertin, Diese Zs. Bd. 150, S. 287 [1925] (*Abh. 56*).

[1]) Biochem. Zs. Bd. 155, S. 334 [1925].

[2]) Diese Zs. Bd. 115, S. 211, und zwar S. 219 u. 220 [1921] (*Abh. 63*).

Nicht nur die maltasearmen Brennereihefen, auf welche die Untersuchung von WILLSTÄTTER und STEIBELT[3] aufmerksam gemacht, auch die maltasereichen Bierhefen sind imstande, die Biose direkt, d. h. ohne vorangehende Hydrolyse, zu vergären.

Experimenteller Teil.

I. Maltasewirkung in sauerem Bereich.

Die Saccharasewirkung ist bekanntlich in sauerem Gebiete optimal und zwar bei p_H = etwa 4,6, in stärker sauerem[4] wird sie herabgesetzt, so daß bei p_H = 2,0 die Zeit der halben Rohrzuckerspaltung 6- bis 14mal größer wird. Die Maltase[5] hingegen wirkt bei neutraler Reaktion optimal, nämlich zwischen p_H = 6,75 und 7,25, und schon eine Acidität von p_H = 5,5 genügte, um den Umsatz in der Zeit, die bei p_H = 6,8 für die Halbspaltung erforderlich ist, auf ungefähr $^1/_4$ herabzusetzen. Diese Angaben bezogen sich auf Autolysate von Brauereihefen. Wir vergleichen nun bei saurerer Reaktion die Geschwindigkeit der Maltosespaltung durch solche Enzymlösungen und durch

[204] Tabelle 1.

p_H-Abhängigkeit der Maltasewirkung von Hefen (bei Gegenwart von Zellgift). (Unter den Bed. der Zeitwertbest. nach WILLSTÄTTER, OPPENHEIMER und STEIBELT, indessen in Vers. 2 mit 1 g Hefetrockengew. auf 100 ccm Bestimmungslös., in Vers. 3 und 4 mit 0,5 g auf 100 ccm.)

Angewandt: 1. Brauereihefe Rs 11/III vom Maltasezeitwert 70
2. ,, Rp 4/VII ,, ,, 30
3. ,, Rc 1/VII ,, ,, 35.

Nr.		p_H	Reaktionszeit Min.			Drehungsabnahme °			Spaltung %		
1	Maltaselösung aus Hefe Rs . .	6,8	31	62	—	1,44	2,03	—	22,5	31,7	—
		5,5	62	168	—	0,58	0,85	—	9,1	13,3	—
		4,5	31	62	168	0,03	0,03	0,03	0,47	0,47	0,47
2	Hefe Rs, verflüssigt	6,8	30,5	62	98	1,55	2,21	2,75	24,2	34,6	43,0
		5,5	62	98	168	0,58	0,70	0,92	9,1	10,9	14,4
		4,5	30	62	168	0,03	0,03	0,03	0,47	0,47	0,47
		3,5	30	62	168	0,03	0,03	0,03	0,47	0,47	0,47
3	Hefe Rs, ohne Verfl., unter Zus. v. Tol. zur Maltoselösung . .	4,5	30	144	—	0,05	0,05	—	0,78	0,78	—
4	Hefe Rp, verflüssigt	6,8	15	30	99	1,10	1,70	2,03	17,2	26,6	45,8
		5,5	15	30	102	0,30	0,45	0,80	4,7	7,0	12,5
5	Hefe Rc, verflüssigt	6,8	45	85	—	1,02	2,57	—	30,0	40,2	—
		5,7	45	85	193	0,47	0,72	1,13	7,3	11,3	17,6

[205] die Hefen selbst (Tab. 1) und finden dabei Übereinstimmung in der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Acidität. Für die Versuche dienten drei verschiedene Proben der maltasereichen Hefen der Löwenbrauerei in München, mit denen wir die Bestimmung unmittelbar nach der Vergiftung mit Essigester ausführten. Die Zeit-Umsatzkurve bei p_H = 5,5 verläuft so flach, daß für die

[3] Über die Gärwirkung maltasearmer Hefen, Diese Zs. Bd. 115, S. 211 [1921].

[4] Vgl. R. WILLSTÄTTER und CH. D. LOWRY, XI. Abh. über Invertin, Diese Zs. Bd. 150, S. 287 [1925].

[5] R. WILLSTÄTTER und E. BAMANN, VI. Mitteil. über Maltase, Diese Zs. (im Druck).

Halbspaltung außerordentlich große Zeiten erforderlich sind. In noch stärker saurem Gebiete wird die Maltase ganz unwirksam. Schon bei $p_H = 4{,}5$ kommt die Spaltung des Malzzuckers zum Stillstand.

Daß an der starken Abnahme der Maltasewirkung in saurer Lösung nicht Enzymzerstörung schuld trägt, sondern nur die für diese Enzymwirkung ungünstige Acidität, geht aus folgendem Versuch hervor. Wir ließen die verflüssigte Hefe (Probe Rc der Tab. 1 und zwar 1 g Hefetrockengewicht auf 100 ccm Bestimmungslösung) 15 Minuten lang bei $p_H = 4{,}5$ auf die Maltoselösung einwirken. Die Spaltung betrug anstatt der bei $p_H = 6{,}8$ gefundenen 25,3% nur 1,7% (Drehungsabnahme 0,11°). Darauf stellten wir durch Zusatz von Dinatriumphosphat wieder optimale Reaktion ein und fanden in weiteren 56 und 75 Minuten 45,4 und 51,5% Spaltung (entsprechend den Drehungsabnahmen von 2,90 und 3,30°) wie im Versuche mit von Anfang an richtiger Acidität der Lösung.

II. Vergleich der Maltasebestimmung und der Maltasewirkung im Gärversuche.

Man darf für genauen Vergleich die Maltasewirkung unter den Bedingungen der Bestimmung und unter den Verhältnissen der Gärung nicht gleich setzen. Denn im Gärversuche wird die entstehende Glucose weggeschafft, während sie im Bestimmungsversuche bei Anwesenheit von Zellgift in wachsender Konzentration auftritt und die Maltasewirkung hemmt. Beobachtungen über diese Hemmung durch Glucose haben schon E. F. ARMSTRONG[1], R. O. HERZOG[2] und R. KUHN[3] mitgeteilt. [206] Einige nachfolgende Versuche mit Brauereihefen sollen den Einfluß der Glucose in saurer und neutraler Lösung vergleichen.

Die Malzzuckerhydrolyse durch Hefe entsprechend 0,5 g Trockengewicht wurde mit 100 ccm 5proz. Bestimmungslösung, andererseits unter Zusatz der äquimolekularen Glucosemenge verfolgt.

Versuch mit Löwenbräuhefe Rp 4/VII.

$p_H = 6{,}8$.

a) Ohne Glucose.

15 Minuten:	Drehungsabnahme	1,10°	Spaltung	17,2%
30 ,,	,,	1,70	,,	26,6
99 ,,	,,	2,93	,,	45,8

b) Mit Glucose.

15 Minuten:	Drehungsabnahme	0,42°	Spaltung	6,57%
30 ,,	,,	0,64	,,	10,0
195 ,,	,,	1,70	,,	26,6

In der Zeit der 50proz. Spaltung der Maltose werden unter dem Einfluß der zugefügten Glucose nur 23% hydrolysiert.

[1] Proc. Roy. Soc. Bd. 73, S. 516 [1904].
[2] IV. Auflage von C. OPPENHEIMER, Die Fermente, Bd. II, S. 988 [1913].
[3] Diese Zs. Bd. 127, S. 234, und zwar S. 239 [1923].

$p_H = 5,5$.

a) Ohne Glucose.

15 Minuten:	Drehungsabnahme 0,30°	Spaltung	4,69 %
30 ,,	,, 0,45	,,	7,05
192 ,,	,, 0,80	,,	12,5

b) Mit Glucose.

15 Minuten:	Drehungsabnahme 0°	Spaltung	—
30 ,,	,, 0,02°	,,	—
192 ,,	,, 0,21	,,	3,28 %

In der Zeit der 50proz. Spaltung der Maltose bei optimalem p_H (6,8) werden bei p_H = 5,5 ohne Glucose 12 %, mit Glucose 3 % hydrolysiert.

Versuch mit Löwenbräuhefe Rc 1/VII.

$p_H = 6,8$.

a) Ohne Glucose.

45 Minuten:	Drehungsabnahme 1,92°	Spaltung	30,0 %
85 ,,	,, 2,57	,,	40,2

b) Mit Glucose.

45 Minuten:	Drehungsabnahme 0,75°	Spaltung	11,7 %
85 ,,	,, 1,13	,,	17,6
193 ,,	,, 1,80	,,	29,6

[207] In der Zeit der Halbspaltung werden unter der Wirkung der zugefügten Glucose nur 24 % Maltose hydrolysiert.

$p_H = 5,7$.

a) Ohne Glucose.

45 Minuten:	Drehungsabnahme 0,47°	Spaltung	7,35 %
85 ,,	,, 0,72	,,	11,3
193 ,,	,, 1,13	,,	17,6

b) Mit Glucose.

45 Minuten:	Drehungsabnahme 0,03°	Spaltung	
85 ,,	,, 0,22	,,	3,44 %
193 ,,	,, 0,39	,,	6,1

In der Zeit der Halbspaltung bei optimalem p_H werden bei p_H = 5,7 ohne Glucose 15 %, mit Glucose 5 % Maltose hydrolysiert.

Die Maltasewirkung bei Beseitigung der Glucose durch Gärung wird demnach größer sein, als der Maltasezeitwert der Hefe anzeigt. Dieser Umstand ist in der Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[1] nicht berücksichtigt, wenn anschließend an den sicheren Nachweis der direkten Malzzuckergärung durch maltasearme Hefen auch über die Möglichkeit der direkten Biosegärung durch maltasereiche Bierhefen Betrachtungen angestellt werden. Danach „läßt die Geschwindigkeitsmessung darauf schließen, daß direkte Vergärung der Maltose neben der indirekten erfolgt. Während nämlich bei dem halben Umsatz die Hydrolyse noch der Gärung etwas vorauseilt, kehrt sich dieses Verhältnis bei weiterem Fortgang der Gärung bald um." Auch in den Versuchen von R. WILLSTÄTTER und CH. D. LOWRY[2] über Vergärung des Rohrzuckers in saurer Lösung durch invertinärmste Hefen wird die In-

[1] Diese Zs. Bd. 115, S. 211, und zwar S. 299 [1921].
[2] XI. Abh. über Invertin, Diese Zs. Bd. 150, S. 287 [1925].

vertinwirkung im Gärversuche gleich geachtet der im Bestimmungsversuche, also unter Bedingungen der Anhäufung von Invertzucker. Es könnte aber auch hier derselbe Fall vorliegen, daß die Inversion im Gärversuch die berechnete überträfe. Die Schlußfolgerung von WILLSTÄTTER und LOWRY wird allerdings durch Berücksichtigung der möglichen [208] Hemmung bei der Invertinbestimmung wenig beeinträchtigt, da schon in den ersten Zeitabschnitten von Gärung und Spaltung, wenn also der mögliche Einfluß der Monosen noch gering ist, das Vorauseilen der Gärung gegenüber der Spaltung vorkommt.

III. Geschwindigkeit der Maltosegärung bei verschiedenen Aciditäten.

Den Gärverlauf beobachteten wir volumetrisch unter den in der vierten Mitteilung für die Bestimmung der Halbgärzeit vorgeschlagenen Bedingungen (30°, 20 ccm 5proz. Maltoselösung, Hefe entspr. 0,2 g Trockengew.). Die Menge der Kohlensäure wurde aber, wie bei H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1], in Büretten über CO_2-gesättigtem Wasser von konstanter Temperatur gemessen. Aus dem vorgeschriebenen Gemisch der Nährstoffe blieb das Monokaliumphosphat weg, da der Puffer genug Phosphat enthielt. Für die p_H-Einstellung war Citrat-Phosphatpuffer am geeignetsten. Er bestand in jedem Gärversuche aus 5 ccm $^m/_3$-Monokaliumphosphat und 5 ccm $^m/_3$-Citronensäure; diese 10 ccm Gemisch von $p_H = 2,5$ wurden mit $^n/_3$-Natronlauge zur gewünschten Acidität eingestellt. Mit Oxalat-Phosphatpuffer, der weniger geeignet ist, fanden wir recht ähnliche Werte. Auch ergaben zum Vergleich beobachtete Vergärungen von Glucose und Saccharose (Tab. 2 und 3) durch Brauerei- und durch Brennereihefen bei verschiedener Acidität, eingestellt mit Citrat-Phosphat- und Oxalat-Phosphatpuffer, übereinstimmend mit den Befunden von H. v. EULER und S. HEINTZE[2] sowie H. v. EULER und K. MYRBÄCK[3], welche die Acidität mit Mineralsäure herstellten, ein sehr breites Maximum der Gärgeschwindigkeit, das sich von etwa $p_H = 3$ bis in die Nähe des Neutralpunktes erstreckt.

[209] Tabelle 2.

Abhängigkeit der Glucosegärung vom p_H; Brauereihefe (Löwenbräu Rs II/III). Die Saccharosegärung verlief ebenso wie die Glucosegärung. (Citrat-Phosphatpuffer; p_H vor und nach dem Gärversuch gemessen.)

Gärdauer (Min.)	$p_H = 2,5$	3,5	4,5	5,5	6,5 → 6,4
			ccm CO_2:		
30	24	26	26	25	24
60	62	67	67	65	64
90	103	112	112	111	110
120	145	157	157	156	156
Halbgärzeit . . . . in Min.	**119**	**111**	**111**	**112**	**112**
extrapol. Indukt. . . . . . . in Min.	16	17	17	18	19
reduz. Halbgärzeit . . . . in Min.	**103**	**94**	**94**	**94**	**93**

[1] Diese Zs. Bd. 120, S. 42 [1922]. [2] Diese Zs. Bd. 108, S. 165 [1919].
[3] Diese Zs. Bd. 131, S. 179 [1923].

Tabelle 3.
Abhängigkeit der Glucose- und Saccharosegärung vom p_H; Brennereihefe Regensburg. (p_H vor und nach dem Gärversuch gemessen.)

Gärdauer (Min.)	Saccharosegärung; Citrat-Phosphatpuffer			Glucosegärung; Oxalat-Phosphatpuffer		
	p_H = 2,5	4,5	6,5 ➤ 6,4	1,5 ➤ 1,8	4,5	6,5 ➤ 5,8
	ccm CO_2.					
30	17	15	12	3,0	20	18
60	45	43	39	7,2	52	51
90	79	77	73	11,0	91	91
120	115	115	113	15,1	131	131
150	154	154	153	19,8	169	169
250	—	—	—	38,8	—	—
Halbgärzeit . . . . (in Min.)	**141**	**141**	**143**	—	**130**	**130**
extrapol. Indukt. . . . . (in Min.)	31	33	37	—	22	23
reduz. Halbgärzeit . . . . (in Min.)	**110**	**108**	**106**	—	**108**	**107**

Versuche mit maltasereicher Bierhefe.

Die Gärung der Maltose durch Löwenbräuhefen verläuft, wie die Versuche der nachfolgenden Tab. 4 ergaben, optimal [210] in einem engen Bereiche von p_H = 4,5 bis 5,5. Zum Unterschied von der Glucose- und Saccharosegärung ist die Geschwindigkeit bei p_H < 4 und > 6 geringer, und zwar beträchtlich geringer bei der ganz schwach sauren Reaktion, die für die Glucose- und Saccharosegärung noch optimal ist.

Die Induktionszeiten sind bei günstigem p_H äußerst gering, sie sind größer bei stärker und besonders bei schwächer saurer Reaktion. Aus der Abb. 1 ergeben sich

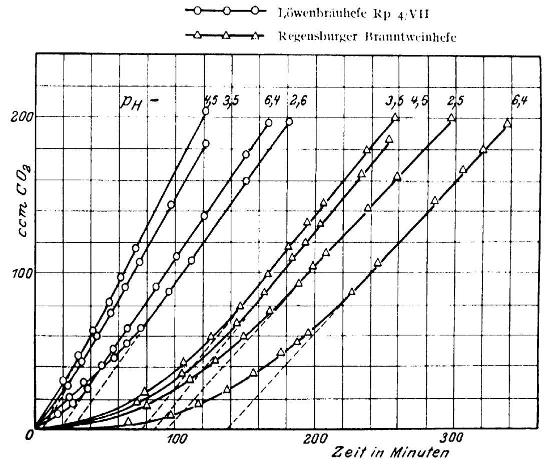


Abb. 1. Maltosegärung durch Bier- und Branntweinhefen bei verschiedenen Aciditäten. (Citrat–Phosphatpuffer.)

die Induktionsperioden, indem an die Gärkurve an ihrem steilsten Abschnitt eine Tangente gelegt wird. Der Abszissenabschnitt von der Nullzeit bis zum Fußpunkt der Tangente stellt die extrapolierte Induktionsperiode dar. Die Unterschiede im

Gärverlauf erscheinen zwar vermindert, bleiben aber dem Sinne nach bestehen, wenn von den Halbgärzeiten die Induktionsperioden abgezogen werden. Wir berechnen die „reduzierten Halbgärzeiten“ wie in der aus unserem Laboratorium hervorgegangenen

[211] Tabelle 4.

p_H-Abhängigkeit der Maltosegärung durch Bierhefe (Löwenbräuhefe Rp 4/VII). Die Gärversuche mit Hefe Rs 11/III ergaben übereinstimmende Werte. (p_H vor und nach dem Gärversuch gemessen.)

Gärdauer (Minuten)	Citrat-phosphat	Oxalat-phosphat	Citrat-phoshat	Citrat-phosphat	Citrat-phosphat	Oxalat-phosphat	Citrat-phosphat	Oxalat-phosphat
	p_H = 2,5 → 2,6	2,5 → 3,0	3,5	4,5	5,5	5,5 → 4,8	6,5 → 6,4	6,5 → 6,2
	ccm CO_2:							
30	25	29	39	44	47	43	20	18
60	51	69	86	98	103	108	58	66
90	83	102	134	150	152	153	98	104
120	120	140	184	204	202	199	137	145
150	159	181	—	—	—	—	176	185
180	198	213	—	—	—	—	—	—
Halbgärzeit (in Minuten)	**138**	**123**	**96**	**86**	**85**	**84**	**125**	**119**
extrapol. Indukt. (in Minuten)	26	—	7	7	6	—	17	—
reduz. Halbgärzeit (in Minuten)	**112**	—	**89**	**79**	**79**	—	**108**	—

[212] Untersuchung von H. SOBOTKA[1] „Zur Kenntnis der Trockenhefe“ mittels jener Tangente. Übereinstimmend wird sie experimentell ermittelt als das 5fache der Zeit-

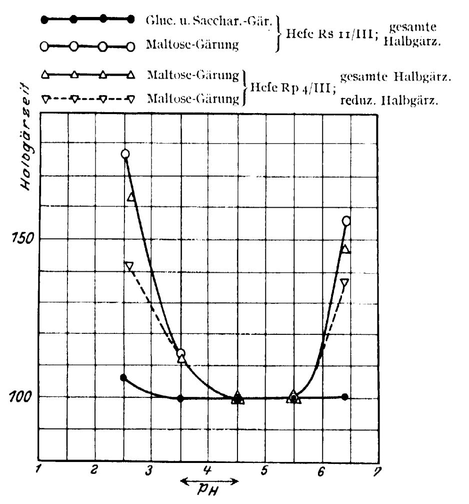


Abb. 2. p_H-Abhängigkeit der Halbgärzeiten von Bierhefen. (Verhältniszahlen mit dem Optimum = 100.)

dauer, welche die Hefe zur Vergärung von 10% der Substrat-Anfangskonzentration benötigt, wenn die CO_2-Entwicklung am lebhaftesten ist, oder etwa gleich dem 5fachen

[1] Inaug.-Diss., München 1922, und Diese Zs. Bd. 134, S. 1 [1923/24] (*Abh. 71*).

der Gärzeit zwischen der Abgabe von 40 und 50% Kohlensäure. Die gesamten und die reduzierten Halbgärzeiten bei wechselndem p_H werden in der Abb. 2 dargestellt neben der so wesentlich davon verschiedenen p_H-Abhängigkeit der Glucose- und Saccharosegärung.

Versuche mit maltasearmer Brennereihefe.

Die „garantiert reine Branntweinhefe der Zuckerraffinerie Frankenthal, Fabrik Regensburg" war in allen untersuchten [214] Proben praktisch frei von Maltase.

[213] Tabelle 5.

p_H-Abhängigkeit der Maltosegärung durch Branntweinhefe.
(p_H vor und nach dem Gärversuch gemessen.)

Gärdauer (Minuten)	Citrat-Phosphat	Oxalat-Phosphat	Citrat-Phosphat	Citrat-Phosphat	Citrat-Phosphat	Oxalat-Phosphat	Citrat-Phosphat	Oxalat-Phosphat
	p_H = 2,5	2,5 ➤ 2,9	3,5	4,5	5,5 ➤ 4,6	5,5 ➤ 4,5	6,5 ➤ 6,4	6,5 ➤ 5,8
	ccm CO_2:							
30	5	4	6	5	5	5	2	2
60	10	9	15	12	8	12	4	4
90	20	17	30	27	26	25	8	8
120	39	33	55	49	47	44	18	22
150	60	57	84	75	73	68	32	41
180	86	88	115	105	103	96	51	67
210	114	122	150	139	134	127	74	95
240	144	157	183	172	162	150	102	124
270	173	191	—	204	202	190	131	156
300	201	—	—		—	—	160	185
330	—	—	—		—	—	190	
Halbgärzeit . . (in Minuten)	**240**	**229**	**206**	**215**	**221**	**225**	**283**	**257**
extrapol. Indukt. (in Minuten)	94	—	78	87	90	—	137	—
reduz. Halbgärzeit . . (in Minuten)	**146**	—	**128**	**128**	**131**	—	**146**	—

Sie verhält sich bei der Gärung des Malzzuckers (Tab. 5 und Abb. 1) im wesentlichen übereinstimmend mit der Bierhefe. Sie zeigt nur einen charakteristischen Unterschied: das Optimum der Gärung liegt in noch stärker sauerem Gebiete, bei p_H = etwa 3,5. Die Halbgärzeit bei $p_H = 2{,}5$ liegt zwischen den bei 4,5 und 6,5 gefundenen Werten, während bei der Bierhefe $p_H = 2{,}5$ ungünstiger als 6,5 ist. Auch für die Rohrzuckergärung (vgl. Tab. 3) erstreckt sich das Optimum weiter in das saure Gebiet als bei Bierhefe; $p_H = 2{,}5$ ist nämlich noch optimal. Die untersuchte Branntweinhefe ist also besonders angepaßt für die Gärung in saurem Gebiet.

Die Induktionsperioden sind durchwegs weit größer als bei maltasereichen Hefen. Die reduzierten Halbgärzeiten ergeben geringere Unterschiede, aber gleichen Sinn der p_H-Abhängigkeit.

Diese Untersuchung hat Herr Privatdozent Dr. RICHARD KUHN durch wertvolle Ratschläge gefördert; wir sprechen ihm dafür unseren aufrichtigen Dank aus.

Zeitschrift für physiologische Chemie **123**, S. 164 [1922].

68. VERGLEICH VON α- UND β-GLUCOSE IN DER GÄRUNG.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und HARRY SOBOTKA.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. August 1922.)

Das verschiedene biochemische Verhalten der α- und β-Glucoside ist eine bekannte und nach allen Richtungen untersuchte Erscheinung. Es ist aber noch nie ein Unterschied im biochemischen Verhalten der zugrunde liegenden beiden Glucosen festgestellt worden. Auf einen solchen wurden wir bei Versuchen aufmerksam gemacht, in denen das optische Drehungsvermögen einer teilweise vergorenen Glucoselösung nachträgliche Zunahme erfuhr, nachdem die Gärung zum Stillstand gebracht war.

In der Absicht, den Effekt zu vergrößern, wurde die Gärung beschleunigt. Es gelang, durch Anwendung von verhältnismäßig viel Hefe, nämlich von 1 Teil abgepreßter guter Brauereihefe auf 2 Teile 5- bis 10proz. Glucoselösung bei 30° unter ständigem Schütteln 30% der theoretischen CO_2-Menge in etwa 10 Minuten zu entbinden, mit der doppelten Hefemenge sogar 50%. Außerdem war es nötig, die erste polarimetrische Ablesung möglichst schnell nach der Unterbrechung der Gärung auszuführen, um die Störung des Gleichgewichtes zwischen α- und β-Glucose in ihrem ursprünglichen Ausmaße kennen zu lernen. Es war möglich, die erforderlichen Operationen — Durchschütteln mit Chloroform, Abzentrifugieren der Hefe, Klären und Filtrieren, all dies tunlichst unter [165] Kühlung — auf 10 Minuten zusammenzudrängen. Das optische Drehungsvermögen im Zeitpunkte der Sistierung läßt sich aus der ersten Ablesung mit Hilfe der folgenden rechnerisch oder graphisch extrapolieren.

20 g Hefe wurden mit CO_2-gesättigtem Wasser (40 ccm) aufgeschlämmt, auf 30° vorgewärmt und dann mit 3 bis 5,6 g Glucose versetzt. Hierauf wurde das Gärkölbchen mit dem Quecksilbergasometer[1] verbunden und geschüttelt, bis nach Ablauf von T Minuten der gewünschte Bruchteil des Kohlendioxyds entwichen war. Nun wurde geöffnet, die Hefe mit Chloroform abgetötet und die Lösung nach dem Klären und zwar um t_1, t_2 . . . Minuten später abgelesen.

[1] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 211, und zwar S. 222 [1921].

Tabelle 1. Ansteigen des Drehungsvermögens in Gärungsrestlösungen.

Nr.	Glucose g	Proz. CO_2 in T Min.	Polarimetrische Bestimmungen: Anfangswert extrapoliert	nach t_1	t_2	t_3	Endwert t_∞
1	3	33 % in 15 Min.	3,03°	3,11° 20 Min.	3,19° 40 Min.	3,27° 80 Min.	3,38°
2	3	30 % in 14 Min.	3,25°	3,32° 13 Min.	3,39° 26 Min.	3,64° 30 + 10 Min.	3,68
3	5,6	40 % in 31 Min.	5,47°	5,67° 24 Min.		5,98° 24 + 60 Min.	5,98
4	4	30 % in 18 Min.	4,92°	5,01° 12 Min.	—	—	5,51

In den Versuchen Nr. 2 und 3 wurde nach 30 bzw. 24 Minuten 1 Tropfen starken Alkalis zugegeben; hierdurch konnte die Einstellung des Gleichgewichtes in kurzer Zeit (10 bzw. 60 Minuten) erzielt werden.

Das Ansteigen des Drehungsvermögens vom Zeitpunkt der beendeten Gärung bis zur Einstellung des Gleichgewichtes betrug etwa 10% des Gleichgewichtswertes. Wenn man aus diesem die Glucosekonzentrationen, die wir übrigens in einer Anzahl [166] Bertrandbestimmungen bestätigt fanden, unter Annahme von $[\alpha]_D = 52^1/_2{}^\circ$ berechnet, ergibt sich für die frische Gärungsrestlösung $[\alpha]_D$ bis herunter zu 46,3°. Daraus läßt sich das Verhältnis zwischen α- und β-Glucose in ihr berechnen, das in Prozenten der Endkonzentration (A_{100}, B_{100}) und der Anfangskonzentration (A, B) angegeben wird. Die Anfangskonzentrationen gemäß dem Gleichgewichtsverhältnis 36,8% für α- und 63,2% für β-Glucose, vermindert um die Endwerte A und B, ergeben die vergorenen Anteile von α und β in Prozenten der angewandten Glucose (A', B').

Bezieht man die vergorenen Mengen von α und β auf die anfangs vorhandenen, so erhält man $n = \frac{36,8 - A}{36,8} : \frac{63,2 - B}{63,2}$ oder $\frac{A'}{36,8} : \frac{B'}{63,2}$; n nähert sich dem Wert 1 mit dem Fortschreiten der Gärung, also mit dem rascheren Verschwinden der α-Form, wie es aus der nach dem Vergärungsgrade angeordneten Tab. 2 ersichtlich ist.

Einen besseren Einblick in den Vorgang als dieses Verhältnis der vergorenen Mengen gestattet der Quotient aus den beiden Gärungsgeschwindigkeiten, der in der folgenden Abhandlung abgeleitet wird. Dieser Quotient k zeigt in vorliegendem Falle keine Konstanz, wie aus der Tab. 2 zu ersehen ist. In diese sind außer den Versuchen der vorigen Tabelle noch zwei weitere Beispiele aufgenommen (Nr. 5 mit 2 g Glucose, 13% CO_2 in 5 Minuten; Nr. 6 mit 2 g Glucose, 30% CO_2 in 11 Minuten).

Die k-Werte der Tab. 2 lassen erkennen, daß auch zu Beginn der Gärung die β-Form zwar dreimal langsamer, aber immerhin merklich gärt. Bis der Traubenzucker zur Hälfte vergoren ist, sinkt das Verhältnis der Geschwindigkeiten in unseren Versuchen von 3 auf $1^1/_2$. Dieser Abfall von k im Verlaufe der Gärung, der ein rasches Abnehmen der überwiegenden Fähigkeit, α-Glucose zu vergären, bedeutet, läßt eine schnelle Anpassung an die β-Form annehmen. Daß diese der Hefe zunächst nicht ebenso taugt, mag zusammenhängen mit der Einstellung der Hefe auf die Reihe

der α-Glucoside und [167] auf die α-glucosidische Natur der Maltose, des gewohnten Substrates. Die Gärung der Maltose fügt sich nicht einfach der Annahme, daß diese

Tabelle 2. Verhältnis der vergorenen Anteile und der Gärungsgeschwindigkeiten von α- und β-Glucose.

Nr.	Restliche Glucose (%)	$[\alpha]_D$	$\left.\begin{matrix}A_{100}\\B_{100}\end{matrix}\right\}$ 100%	$\left.\begin{matrix}A\\B\end{matrix}\right\}$ p%	$\left.\begin{matrix}A'\\B'\end{matrix}\right\}$ 100-p%	*n*	*k*
5	85,8	48,4°	32,3	27,7	9,1	3,06	3,37
			67,7	58,1	5,1		
4	72,8	46,8°	30,5	22,2	14,6	1,99	2,27
			69,5	50,6	12,6		
2	64,7	46,3°	30,0	19,3	17,5	1,68	1,95
			70,0	45,4	17,8		
6	60,7	46,5°	30,2	18,3	18,5	1,53	1,74
			69,8	42,4	20,8		
1	59,6	47,0°	30,8	18,2	18,6	1,46	1,65
			69,2	41,2	22,0		
3	56,5	48,0°	31,9	18,0	18,8	1,30	1,44
			68,1	38,5	24,7		

Biose zunächst durch Maltase gespalten werde, wobei übrigens auch überwiegend α-Glucose auftritt, sondern es wird nach den Beobachtungen von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[1] direkte Gärung der Maltose von maltasearmen Hefen bewirkt und kommt auch bei maltasereichen Hefen in Betracht. In der Maltoseformel[2]

$$\begin{array}{l}
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad O \\
CH_2(OH)\cdot CH(OH)\cdot CH\cdot CH(OH)\cdot CH(OH)\cdot CH \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad O \\
CH(OH)\cdot CH(OH)\cdot CH(OH)\cdot CH\cdot CH(OH)\cdot CH_2 \\
\qquad\qquad\quad O
\end{array}$$

ist die glucosidische α-Glucose mit der primären Alkoholgruppe der aldehydischen Glucose verbunden. Wie aus den [168] Erörterungen von H. v. EULER und K. JOSEPHSON[1]) hervorgeht, ist es wohl möglich, daß die Gärung, bevor die Glucosidbindung gelöst wird, an dem glucosidisch gebundenen Glucosemolekül angreift, nicht am Kohlenstoffatom 1 (in der Formel fettgedruckt), sondern an einer anderen Stelle dieses α-Glucoserestes.

Aus dem Verhalten von α- und β-Glucose im Gemisch darf nun nicht gefolgert werden, daß β-Glucose auch für sich allein langsamer gäre als α-Glucose oder Gleichgewichtsglucose, die auch genügend α-Form enthält. Dies zeigt der folgende Vergleich, für den wir 10 g frische Löwenbräuhefe auf je 10 ccm der 10proz. Lösungen bei ununterbrochenem Schütteln zur Einwirkung brachten. Das Auflösen der beiden festen Formen und das Aufschlämmen in allen drei Fällen beanspruchte je 30 bis 50 Sekunden. Die β-Glucose war nach R. BEHREND[2]) dargestellt und von dem anhaftenden Pyridin

[1] a. a. O.

[2] W. N. HAWORTH und G. C. LEITCH, The Constitution of the Disaccharides. Part III. Jl. Chem. Soc. Bd. 115, S. 809 [1919].

[1]) Diese Zs. Bd. 120, S. 42, und zwar S. 58 [1922].

[2]) Liebigs Ann. der Chem. Bd. 353, S. 106f. [1907].

durch 1stündiges vorsichtiges Erhitzen auf 110° befreit worden. Nach dieser Behandlung wurde das spezifische Drehungsvermögen 4 Minuten nach dem Auflösen zu 20,9° gefunden und $[\alpha]_D = 19,8°$ ermittelt.

Temperatur 31°; CO_2 aus 1 g Hexose, bei 22° und 717 mm gemessen, 291 ccm.

Minuten	2	4	6	8	10	12	14	Halbe Gärung
α-Form	12	33	64	97	132	160	186 ccm	11 Minuten
Gleichgew.	14	36	67	113	145	180	202 ccm	10 Minuten
β-Form	14	31	62	97	131	169	188 ccm	10³/₄ Minuten

Alle drei Glucosen gären also gleich schnell, ohne daß bei einer Vergärung von 50% in 11 Minuten eine Isomerisation in ausschlaggebendem Maße möglich wäre. Diese geht nämlich 10mal langsamer von statten, z. B. wurden in unserem Versuch in 6 Minuten 20% Zucker vergoren, während die Umlagerung unter den nämlichen Bedingungen in dieser Zeit kaum 2% erfaßt; 20% α-Form finden wir aus reiner β-Glucose erst [169] in 62 Minuten gebildet. Auch das schwach sauere Milieu bei der Gärung wirkt darauf nicht beschleunigend. Die Einstellung des Gleichgewichtes wird nämlich durch Hydroxylionen 40000mal stärker beschleunigt als durch Wasserstoffionen, so daß bei schwach saurer Reaktion (p_H = ca. 3,6) die Geschwindigkeit der Mutarotation ein Minimum erreicht[1].

[1] C. S. HUDSON, Catalysis by acids and bases of the mutarotation of glucose, Jl. Amer. Soc. Bd. 29, S. 1571 [1907]; H. v. EULER und A. HEDELIUS, Biochem. Zs. Bd. 107, S. 150 [1920].

Zeitschrift für physiologische Chemie 123, S. 170 [1922].

69. ÜBER AUSWÄHLENDE GÄRUNG VON ZUCKERGEMISCHEN.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und HARRY SOBOTKA.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 1 Abbildung im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 11. August 1922.)

Theoretisches über auswählende Gärung.

Aus den Arbeiten von A. SLATOR[1] über die Gärung von Zuckergemischen geht hervor, daß nur ein Teil des Gärungsmechanismus für die einzelnen Zuckerarten spezifisch ist[2]. Während bei den verschiedenen Zymohexosen bereits Identität der Zerfallsprodukte mit 3 Kohlenstoffatomen zu erwarten ist, was z. B. für Galaktose von M. TOMITA[3] bestätigt wurde, gibt es in den ersten Stadien der Gärung Fälle ausgeprägter Spezifität. Diese kann in der Geschwindigkeit der Gärung einzelner Zucker nicht immer zum Ausdruck gelangen, weil eine spätere, mehreren Zuckern gemeinsame Teilreaktion als langsamste die Rolle eines „limitierenden Faktors" ausübt und für die verschiedenen Substrate gleiche Umsatzgeschwindigkeit bewirkt. Vergärt man dagegen ein Gemisch zweier Zymohexosen, so tritt, und zwar selbst bei den isomeren d-Glucosen, der Fall [171] ein, daß ein Zucker gegenüber dem anderen bevorzugt wird, daß also eine auswählende Gärung erfolgt.

Aus der Analyse des Restzuckers bei unterbrochener Gärung eines Zuckergemisches läßt sich der Quotient

$$\frac{\text{Vergorener Bruchteil des vorgezogenen Zuckers}}{\text{Vergorener Bruchteil des zurückgesetzten Zuckers}}$$

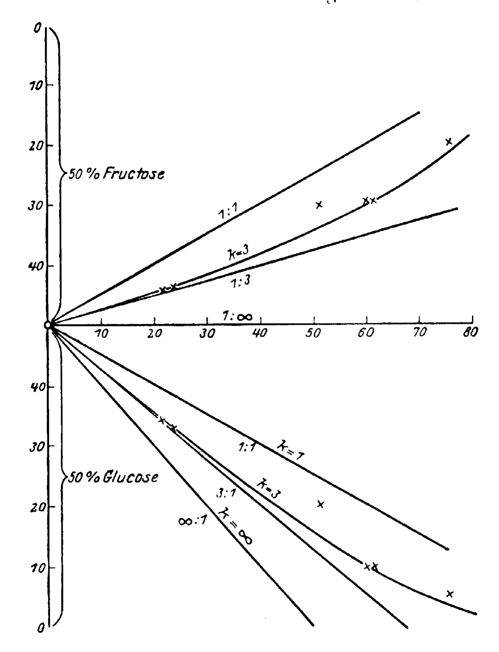
berechnen. Die Gärgeschwindigkeit ist bekanntlich nur von der Hefekonzentration, nicht aber von der Zuckerkonzentration abhängig. Wenn nun bei der Gärung eines Gemisches der in der Zeiteinheit vergorene Betrag in konstantem Verhältnis, also auch unabhängig von den Partialkonzentrationen auf die beiden Komponenten

[1] Studies in fermentation, Jl. Chem. Soc. Bd. 89, S. 128 [1906]; Bd. 93, S. 217 [1908].

[2] Zit. n. A. HARDEN, „Alcoholic fermentation", 2. Aufl., S. 124, London 1914.

[3] Über die Umsetzung der Galaktose nach der zweiten Vergärungsform, Biochem. Zs. Bd. 121, S. 164 [1921].

entfiele, so bliebe dieser Quotient bis zum Verschwinden der schneller gärenden Form konstant. Dieser Zustand würde in der Abbildung durch 2 Gerade zur Anschauung



[172] kommen, die in dem Punkt o entsprängen und deren untere, abwärts gerichtete, zwischen den beiden eingezeichneten Geraden verliefe, welche die Grenzfälle 1:1 und ∞:1 darstellen (z. B. Gerade 3:1 der Abbildung). Eine solche Annahme ist indessen wenig wahrscheinlich.

Es seien zum Vergleich in einen Behälter 2 Arten von Kugeln eingefüllt, 60 schwerere und 60 leichtere, die durch Schütteln ständig vermischt werden. Aus einer Öffnung sollen 6 Kugeln/Sek. herausfallen und die Verteilung auf die beiden Arten stehe in linearer Abhängigkeit von den Partialkonzentrationen. Die Wahrscheinlichkeit für das Herausfallen einer schwereren Kugel betrage $^2/_3$; es werden also zunächst immer 4 schwere und 2 leichte ausgeworfen. Hierdurch verschieben sich die Anteile in dem Behälter zuungunsten der schwereren Kugeln, so daß nach 10 Sekunden nur noch 20 schwere neben 40 leichten Kugeln vorhanden sind. Infolgedessen vermindert sich die Wahrscheinlichkeit herauszufallen für die schwereren Kugeln; es werden jetzt gleich viele Kugeln, 3 und 3, von jeder Sorte herausfallen. Dadurch verschlechtert sich das Verhältnis weiter zuungunsten der schwereren Kugeln usw.

Für die auswählende Gärung ergeben sich bei Anwendung der Infinitesimalrechnung folgende Ausdrücke:

A. x	= y	+ z
Gesamtkonzentration	Konz. d. schnellgärenden Form	Konz. d. langsamgärenden Form

B. $\left(-\frac{dy}{dt}\right) + \left(-\frac{dz}{dt}\right) = -\frac{dx}{dt}$ (konstante Gärgeschwindigkeit).

C. $-\frac{dy}{dt} : -\frac{dz}{dt} = ky : z$, wobei k das Verhältnis der beiden Gärgeschwindigkeiten zu einander bedeutet. Aus Gleichung C. folgt

D. $\frac{dy}{y} = k \cdot \frac{dz}{z}$; hieraus durch Integration:

E. $k \cdot \ln z = \ln y + C$; die unbekannte Integrationskonstante C eliminiert man:

E'. $k (\ln z_0 - \ln z) = \ln y_0 - \ln y$. Die aus

F. $k = \frac{\ln y_0 - \ln y}{\ln z_0 - \ln z}$ berechneten Werte für k bedeuten das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten.

„k" zeigte bei dem in der vorhergehenden Abhandlung untersuchten Gemisch keine Konstanz. Es wurde deshalb auch die Annahme rechnerisch geprüft, daß die auswählende Reaktion nicht monomolekular, sondern bi- oder trimolekular in bezug auf das Substrat erfolgt. Auch die auf diesen Grundlagen berechneten Werte für „k" zeigten in dem Falle der beiden Glucosen raschen Abfall im Verlauf der Gärung.

[173] In der Abbildung sind die Schaulinien für $k = \infty$, $k = 3$ und $k = 1$ ausgezogen. Im ersten Falle würde zuerst die eine Form linear verschwinden und erst dann begänne die lineare Gärung der anderen Form. Im letzten Falle verteilt sich der verschwindende Zucker in gleicher Menge auf beide. Für die dazwischen liegenden Fälle gehört zu jedem k eine Kurve, von denen die für $k = 3$ eingezeichnet ist. Das Diagramm verändert sich nicht prinzipiell, wenn die Anfangskonzentrationen der beiden Hexosen von einander verschieden sind.

Auswählende Gärung von Invertzucker.

Die in der vorhergehenden Abhandlung zum erstenmal für Gleichgewichtsglucose beschriebene Erscheinung der auswählenden Gärung ist für den Fall von Invertzucker schon A. P. DUBRUNFAUT[1] bekannt gewesen. Die Glucose wird vorgezogen, was viel später W. L. HIEPE[2] für die verschiedensten Hefen bestätigte. Nur Saccharomyces exiguus und eine von U. GAYON und E. DUBOURG[3] beschriebene Weinhefe zeigten ein umgekehrtes Verhalten. Auch andere Mikroorganismen ziehen vielen Angaben zufolge Glucose vor.

Hingegen wird die Gärung der einzelnen Zucker d-Glucose und d-Fructose meist als gleich schnell beschrieben, was wir sowohl bei unter- wie obergäriger Hefe oft und genau bestätigt fanden.

Bei den isomeren d-Glucosen war die Beobachtung der auswählenden Gärung nur bei besonders beschleunigter Ausführung des Prozesses möglich, denn infolge der raschen Einstellung des Gleichgewichts zwischen beiden Zuckern können bei langsamer Gärung nur die mit 1:1 bezeichneten Kurven zur Beobachtung gelangen. Die bei einer Schnellgärung zum Vorschein kommende Abweichung klingt bereits im Verlauf von 1 bis 3 Stunden nach der Unterbrechung ab.

---

[1] C. R. Bd. 25, S. 307 [1847].
[2] Jl. Fed. Inst. Brew. Bd. 1, S. 288 [1895]; Chem. Zbl. 1897, I, 1241.
[3] C. R. Bd. 110, S. 865 [1890].

Die auswählende Vergärung des Invertzuckers, auf welche [174] die theoretisch abgeleitete Formel angewandt werden soll, ist für die quantitative Verfolgung geeigneter. Die oben erwähnten Schwierigkeiten fallen hier fort, es besteht kein Unterschied zwischen den Restlösungen rascher und langsamer Gärung. Von dem Versuchsmaterial sollen in der Tabelle nur die Ergebnisse angeführt werden; sie wurden durch Kombination der polarimetrischen und reduktometrischen Bestimmungen gewonnen [1].

Tabelle. Unterbrochene Gärung von Invertzucker, bzw. Saccharose [2].

Nr.	Hexose	g Hefe (Tr-Geh.)	CO_2 %	$[\alpha]_D$ (% Fructose)	Restlicher Zucker % Glucose Fructose	Vergorener Zucker % Glucose Fructose	n	k
1	1 g	0,5 (20 %)	33	51,8° (73,1)	10,4 28,2 und 1,6 Sacch.	38,8 21,0	1,85	**2,83**
2	1 g	0,5 (20 %)	50	−62,0° (80,3)	4,9 19,7	45,1 30,3	1,40	(2,44)
3	2 g	2 (20 %)	16,6	26,6° (55,6)	34,7 44,1	15,3 5,9	2,50	**2,90**
4	2 g	2 (20 %)	25	−28,4° (56,8)	33,0 43,6	17,0 6,4	2,81	**3,04**
5	1 g	1 (21 %)	43	−53,7° (74,5)	10,0 20,1	40,0 20,0	1,91	**2,97**
							Mittel a. 4 Vers.	**2,94**
6 [3]	2 g	6 (35,8 %)	45	34,5° (61,0)	10,1 29,9	30,9 20,1	1,54	1,89

[175] Die Tabelle weist für die oben eingeführte Konstante k gute Übereinstimmung auf; diese wird auch in der Abbildung anschaulich, in der die beobachteten Werte auf die Kurve für $k = 3$ fallen.

Wenn wir diese Erscheinung der auswählenden Gärung zu erklären suchen, so ist zu berücksichtigen, daß Glucose, Fructose und ihr Gemisch mit gleichen Geschwindigkeiten gären. Da nun aus den Versuchen hervorgeht, daß die Hefe das Gemisch von Glucose und Fructose doch auswählend vergärt, so ist es wahrscheinlich, daß im Verlaufe der Gärung eine Teilreaktion langsam genug erfolgt, um auch von Fructose allein erreicht zu werden. Der Vorgang, der die Größe von k bedingt, wird also wohl jener Reaktion vorausgehen, deren Geschwindigkeit gleichbedeutend mit der zu beobachtenden Gärungsgeschwindigkeit ist.

Analoge Betrachtungen gelten für die auswählende Gärung der beiden d-Glucosen.

[1] Vgl. R. Willstätter und G. Oppenheimer, Diese Zs. Bd. 118, S. 168, und zwar 187 und 188 [1922] (*Abh. 64*).

[2] Die Inversion eilt der Gärung so schnell voraus, daß durch Anwendung der Biose kein Unterschied bewirkt wird.

[3] Fructosegewöhnung. In Versuch Nr. 6 wurde eine auf Fructose gezüchtete Hefe verwendet. Frische Löwenbräuhefe — wie in den übrigen Versuchen — wurde innerhalb 4 Tagen im 10fachen Volumen von sterilisiertem Hefenwasser 3mal mit je 80 % ihres Gewichts (im ganzen mit mehr als dem 10fachen ihres Trockengewichts) an Fructose versetzt. Mit der durch Abzentrifugieren wiedergewonnenen Hefe fanden wir den Geschwindigkeitsquotienten „k" sichtlich zugunsten der Fructosegärung verschoben.

Zeitschrift für physiologische Chemie **123**, S. 176 [1922].

70. ÜBER AUSWÄHLENDE GÄRUNG MIT GALAKTOSEGEWÖHNTEN HEFEN.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und HARRY SOBOTKA.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. August 1922.)

In der Literatur[1] finden sich zahlreiche Angaben, daß die meisten Hefen, die unvermögend sind, Galaktose zu vergären, durch Züchtung in Lösungen dieses Substrates die Fähigkeit der Galaktosevergärung erlangen. Das Verhältnis der Gärfähigkeit für Galaktose zu jener für Glucose kann durch den Quotienten aus den Halbgärzeiten[2] oder durch das reziproke Verhältnis der entwickelten CO_2-Mengen im Zeitpunkte halber Gärung von Glucose ausgedrückt werden. Diese Verhältnisse erreichen im Verlaufe der Gewöhnung den Wert 1:1 und können ihn bei manchen Hefen zugunsten der Galaktose überschreiten. A. SLATOR erreichte ein Verhältnis von 155:100 für die Anfangsgärgeschwindigkeit, d. i. etwa 65:100 für das Verhältnis der Halbgärzeiten, A. HARDEN und R. V. NORRIS ein solches von 84:100. In unseren Versuchen sank die Halbgärzeit für Galaktose bis auf 75/100 des Wertes für **[177]** Glucose; freilich war zugleich die absolute Gärkraft der Hefe zurückgegangen.

Durch diese „Übergewöhnungen" wird die Annahme EULERS[1]) in Frage gestellt, daß bei der Galaktosegewöhnung eine „Galaktase" entstehe, welche die Galaktose erst in Glucose, Enolglucose oder ein ähnliches eng mit Glucose verwandtes Produkt verwandle. Gegen eine solche „indirekte" Galaktosegärung dürfte auch — im Sinne der Hardenschen Phosphattheorie — die Untersuchung des von HARDEN und NORRIS beschriebenen Galaktosephosphorsäureesters sprechen.

---

[1] E. F. ARMSTRONG, Proc. R. Soc. Bd. 76, S. 600 (B) [1905]. Chem. Zbl. 1905, II, 1807. A. SLATOR, Journ. Chem. Soc. Bd. 89, S. 128 [1906], Bd. 93, S. 217 [1908]. A. HARDEN und R. V. NORRIS, Proc. R. Soc. Bd. 82, S. 645 (B) [1910]. H. v. EULER und D. JOHANSSON, Diese Zs. Bd. 78, S. 246 [1912]. H. v. EULER, J. LAURIN und A. PETERSSEN, Biochem. Zs. Bd. 114, S. 277 [1921]. R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 211, und zwar 233 [1921] u. a. m.

[2] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, a. a. O., und zwar S. 219 (*Abh. 63*).

[1]) H. v. EULER, Chemie der Enzyme. München und Wiesbaden 1920, 2. Aufl. I. Teil, S. 293 f.

Daß die Vergärungen von Glucose und Galaktose parallele Prozesse sind, die erst in einem späteren Stadium der Gärung[2] zusammenfallen, geht am besten aus Gärungsversuchen mit Zuckergemischen hervor, die wir analog den Versuchen der beiden vorhergehenden Abhandlungen angestellt haben. Sie ergaben, daß sich das Verhältnis der Gärgeschwindigkeiten im Gemisch wesentlich zugunsten schnellerer Glucosegärung von dem Geschwindigkeitsverhältnis der Einzelgärungen unterscheidet. Das Verhältnis der vergorenen Zuckermengen unterliegt hier zwei einander entgegengerichteten Einflüssen. Einerseits verschiebt sich dieses Verhältnis parallel der Anreicherung der langsamer verschwindenden Substanz zu deren Gunsten, wenn der Quotient der beiden Gärgeschwindigkeiten (k) konstant ist[3]. Entgegen wirkt andererseits die Regeneration des Glucosegärvermögens infolge der Gegenwart dieses Zuckers. Dieser Einfluß konnte nicht genau bestimmt werden. Er kann sich aber keinesfalls so schnell geltend machen, daß er das Verhältnis 80:100 in ein Verhältnis umkehrt, welches durch $k = 1000:100$ ausgedrückt wäre.

Der Erscheinung, daß eine an Galaktose gut gewöhnte Hefe Galaktose allein schneller als Glucose allein vergärt, in einem Gemisch beider Zucker dagegen die Glucose vorzieht, genügt folgendes kinetisches Schema:

[178] A. Glucose (I) → $Z_I Gl$ —(II)→ Z_{II} ←(II)— $Z_I Ga$ ←(I) Galaktose
Z_{II} —(III)→

1. Bei den Einzelgärungen seien die Reaktionen (I) die kontrollierenden, die langsamsten Reaktionen. Durch die Anpassung ist die Hefe in den Stand gesetzt worden, diese Reaktion mit Galaktose schneller als mit Glucose vorzunehmen; infolgedessen raschere Galaktosegärung.

2. Im Gemisch befinden sich beide Substrate in nur halb so großer Einzelkonzentration. Dadurch ist die in doppelter Konzentration zu bewältigende Reaktion (III) zur limitierenden geworden, und sie hängt von der Konzentration des gemeinsamen Zwischenproduktes Z_{II} ab. Dieses entsteht aus den Zwischenkörpern $Z_I Gl$ und $Z_I Ga$ mit verschiedener, für das Glucosederivat größerer Geschwindigkeit. Die Glucose wird also schneller gären, wenn auch die mit (I) bezeichneten Vorgänge im Galaktosesystem rascher erfolgen. Dieser Art läßt sich die Umkehrung jenes Verhältnisses erklären, während Schema B die Möglichkeit, daß Galaktose schneller als Glucose vergoren wird, und die beiden Schemata B und C, welche H. v. EULERS Auffassung wiedergeben, den obigen Effekt unerklärt lassen.

B. Glucose ← Galaktose
Glucose → Gärung

C. Glucose → Z_I ← Galaktose
Z_I → Gärung

Experimentelles.

Für unsere Versuche diente Unterhefe aus der Münchener Löwenbrauerei sowie obergärige Hefe der Sinner A. G. in Grünwinkel bei Karlsruhe. Als Gewöhnungslösung diente ein Hefendekokt, welches vor und nach dem Galaktosezusatz sterilisiert wurde. Die Kulturen standen bei ca. 25°.

[2] Vgl. M. TOMITA, Biochem. Zs. Bd. 121, S. 164 [1921].
[3] Siehe die (*voranstehende*) Abh. „Über auswählende Gärung von Zuckergemischen".

1. Einzelgärungen wurden nach den Bedingungen der Halbgärzeitdefinition ausgeführt. Die aufeinanderfolgenden Stufen einer Gewöhnungsreihe mit Brauereihefe führten zu überlegenem Galaktosegärungsvermögen, wie aus der Tab. 1 hervorgeht.

Das Verhältnis der Gärgeschwindigkeiten bleibt während der Gärung nicht gleich. Zu Anfang wächst es zugunsten [179] der Glucosegärung infolge der erwähnten

Tabelle 1. Galaktosegewöhnung von Löwenbräuhefe.

Hefe	Halbgärzeit für Galaktose (in Minuten)	Halbgärzeit für Glucose (in Minuten)	Verhältnis der Halbgärzeiten Gal. : Gluc.	Verhältnis der CO_2-Vol. bei Glucosehalbgärzeit Gluc. : Gal.
Löwenbräu	∞	150—200		—
Gal. I	650	235	280 : 100	300 : 100
Gal. II	400	295	135 : 100	140 : 100
Gal. III	600	485	125 : 100	120 : 100
Gal. IV	720	860	80 : 100	—
Gal. V	ca. 930	ca. 1230	75 : 100	—

Tabelle 2. Unterbrochene Gärung von Glucose-Galaktose-Gemisch.

Hefe	Dauer Min.	CO_2 %	Gärungsrestlösung Bertr. best. %	Gärungsrestlösung $[\alpha]_D$	Gärungsrestlösung Gluc. Gal. %	Vergoren Gluc. Gal. %	n	k
Gal. III	185	27	59,5	72,3°	16,0 42,6	33,1 7,4	4,47	6,77
Gal. III	305	50	27,0	95,3° [1]		—		
Gal. IV	900	89	12,0	83,4° [1]	—	—	—	—
Gal. V	720	46	45,6	76,8°	5,5 40,1	44,5 9,9	4,49	10,00
Sinner Gal. gew.	390	30	56,9	73,7°	13,3 43,6	36,7 6,4	5,73	9,66

Regeneration. Im ersten Drittel der Glucosegärung erreicht es sein Maximum und fällt dann erst nach dem zweiten Drittel, sobald sie hinter dem linearen Verlauf zurückzubleiben beginnt, allmählich ab. [180] Die in der Tabelle angeführten beiden Ausdrücke geben ein gutes Bild des durchschnittlichen Verhältnisses der beiden Geschwindigkeiten.

2. Gemischgärungen. Mit den galaktosegewöhnten Hefen der angeführten Versuchsreihe und mit einer obergärigen Hefe, die in den Einzelgärungen ungefähr das Verhältnis 300:100 erreichte, sind die in der Tab. 2 zusammengestellten Gärungen von Glucose-Galaktose-Gemischen (0,5 g Glucose + 0,5 g Galaktose) ausgeführt worden. Im Zeitpunkte der Halbgärung war die Glucose aufgebraucht. Unterbrach man die Gärung früher, so ergaben sich für den Geschwindigkeitsquotienten k trotz Übergewöhnung der Hefe Werte entsprechend 6- bis 10fach überwiegendem Glucosegärvermögen.

[1] Für höhere Vergärungsgrade überschreiten die $[\alpha]_D$-Werte den Wert 80,2° für reine Galaktose. Man wird hier neben Anreicherung dieses Zuckers das Entstehen stärker rechts drehender, nicht oder weniger reduzierender Neben- oder Zwischenprodukte anzunehmen haben.

Zeitschrift für physiologische Chemie 134, S. 1 [1924].

71. ZUR KENNTNIS DER TROCKENHEFE.

Von HARRY SOBOTKA*.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 2 Abbildungen im Text

(Der Redaktion zugegangen am 20. November 1923.)

Die Untersuchung der Vergärung von Zuckerlösungen durch Trockenhefe verspricht dank ihrer scheinbaren Mittelstellung zwischen Zellgärung und zellfreier Gärung zur Aufklärung des Mechanismus alkoholischer Gärungen beizutragen. Die folgenden Versuche sollen die quantitativen Verhältnisse bei der Gärung mit Trockenhefe kennen lehren; ferner haben sie den Zusammenhang von Stärke und Verlauf dieser Gärung mit den Bedingungen zum Gegenstand, unter welchen die Trocknung stattfand. Deren Extreme, zwischen die zahlreiche Abstufungen eingeschaltet wurden, bildete einerseits langsame Trocknung bei normaler Temperatur, andererseits Behandlung mit einem so scharfen Trockenmittel wie Aceton oder Einspritzung in einen heißen Luftstrom.

Gärungen mit Trockenhefe bieten ein typisches Bild: Nach Ablauf einer mehr oder minder scharf ausgeprägten Induktionsperiode beginnt die Kohlendioxydentwicklung, sie steigt bis zu einem Maximum pro Zeiteinheit, welches sie bis zum Verschwinden der Hauptmenge des Zuckers beibehält. Als nächstliegende Erklärung bietet sich die Annahme, daß die trockenen Zellen in der Zuckerlösung erst allmählich ihre Gärkraft wieder gewinnen.
[2] E. ABDERHALDEN[1], der Trockenhefegärungen mit noch längeren Induktionszeiten beschreibt, als hier beobachtet werden konnten, führt diese Erscheinung auf das Aufleben und in Erweiterung dieser Erklärung auf das Sprossen der überlebenden Zellen zurück.

Aus den Gärungskurven lassen sich für jede Trockenhefe graphisch zwei Daten gewinnen: die Dauer der Induktion und die definitive Gärgeschwindigkeit.

* *Auszug aus der unter meiner Leitung ausgeführten Inauguraldissertation, München 1922.*

[1] E. ABDERHALDEN und A. FODOR, Fermentforschung Bd. 5, S. 138, und zwar S. 147 [1921/22].

Dieser doppelten Mannigfaltigkeit an charakterisierenden Daten entsprechen zwei nicht voneinander abhängige Eigenschaften der Trockenhefen.

Die Gärgeschwindigkeit, verglichen mit der Gärgeschwindigkeit derselben Hefe in frischem Zustand, gibt die Zymaseausbeute an und wird weiterhin zum Vergleich mit dem Betrage freier Zymase dienen können, den der Macerationssaft aus derselben Trockenhefe enthält. Der Quotient der Gärkraft getrockneter und frischer Hefe ist ferner gleich dem Prozentsatz lebender Zellen in dem untersuchten Präparat, die allenfalls neugebildeten Zellen inbegriffen, unter der Annahme, daß erstens bloß die lebenden Zellen den Zucker angreifen und daß zweitens die einzelne Zelle die gleiche Gärkraft wie vor der Wasserentziehung wiedererlangt; dabei wird vorausgesetzt, daß innerhalb der untersuchten Konzentration die Gärkraft proportional der Anzahl lebender Zellen ist; dies wurde in einem Kontrollversuch für die fraglichen Konzentrationen lebender und getrockneter Hefe bestätigt.

Bei der langsamen Trocknung einer Brauereihefe behielt z. B. nur ein Zehntel der Zellen seine Gärkraft, die widerstandsfähigere Bäckereihefe blieb dagegen zu einem guten Dritteil unzerstört. In dem warmen Luftstrom des Faust-Heimschen Apparates konnte ein Viertel der Zellen von Unterhefe konserviert werden und durch Zerstäubung in eine geheizte Kammer oder durch die plötzliche Wasserentziehung durch Aceton wurde bei verschiedenen Hefeproben ein Fünftel bis über ein Drittel des Pilzes in gärfähigem Zustand fixiert.

[3] Wie tiefgreifend jedoch die einzelne Zelle durch die Trocknung verändert ist, wird durch die Dauer der Induktion angegeben. Jene Zellen, die nicht irreversibler Zerstörung anheimfielen, benötigen je nach der Intensität der Trocknung verschiedene Zeiten, um nach Quellung der Membran auch in ihrem plasmatischen Innern jenen Mindestbetrag von Feuchtigkeit aufzunehmen, der ihr Zymasesystem wieder in Funktion treten läßt. Die Wiederaufnahme des Wassers erfolgt bei den langsam getrockneten Hefen im allgemeinen schnell, langsam aber bei jenen, deren Zellmembran durch plötzliche und intensive Trocknung, vielleicht bei Acetonhefen speziell durch chemische Einwirkung, besonders schwer quellbar geworden ist. Die untersuchte Bäckereihefe war der Feuchtigkeit in jedem Fall schwerer zugänglich als die ebenso behandelte Brauereihefe; dieses Verhalten hat in der dickeren, schon ursprünglich widerstandsfähigeren Membran der Bäckereihefe seinen Grund.

Für die Dauer der Induktion ist nächst der Methode der Trocknung und dem Typus der Hefe auch die Hefekonzentration des Gärversuches wichtig. Nicht nur, daß mit der Hefekonzentration die Anzahl der lebenden Zellen und damit die Gärkraft wächst — auch die Konzentration der lebensunfähigen Zellen steigt und erreicht Beträge, bei denen bereits Maceration[1] auftritt und den überlebenden Zellen organische Substanz zur Ernährung und zur Fortpflanzung darbietet. In diesen Fällen mag auch eine zellfreie Saftgärung nebenher laufen, worauf weiter unten anläßlich der Wirkung von Narkoticis zurückzukommen sein wird.

Es scheint übrigens, ebenso wie beim Verhalten kleiner Mengen Frischhefe gegen Zuckerlösungen, einen Schwellenwert für die Hefekonzentration zu geben, unterhalb dessen der Zuckerverbrauch nicht der Gärung, sondern nur der Substanzvermehrung des Pilzes zugute kommt.

[1] A. v. Lebedeff, Ann. Inst. Past. Bd. 25, S. 682, Tab. I und Bd. 26, S. 8 [1912]. — Auch Acetonhefe gibt mit der 3fachen, ja auch noch mit der 7fachen Menge Wasser einen gärfähigen Macerationssaft.

Je feiner die Hefe bei der Trocknung verteilt war und je einheitlicher infolgedessen ihr Trocknungsgrad ist, desto schärfer wird die Induktionsperiode gegen die Gärung absetzen. Wenn die Zellen eines Präparates in verschiedenem Grade ihrer Vitalität beraubt sind, so wird diese auch in entsprechender Weise wiedergewonnen, so daß bei Betrachtung der [4] Gesamtheit der Hefezellen die Gärkraft ohne deutliche Ruhepause allmählich bis zu einem Höchstwert anwächst.

Wenn die ausgegorene Lösung rechtzeitig von neuem mit Zucker versetzt wird, so beginnt die Gärung sofort, allerdings ist dabei der schädliche Einfluß des bereits vorhandenen Alkohols zu berücksichtigen. Wenn man zwischen dem Verschwinden der ersten und dem Zufügen der zweiten Zuckerdosis der Hefe Zeit gibt, zu degenerieren, so muß sich erst von neuem lebende Hefe über das erwähnte Minimum hinaus entwickeln, so daß eine abermalige Induktion auftritt. Inkubation der Trockenhefe in einer Zuckerlösung veranlaßte eine Verkürzung der Induktionsdauer bei der folgenden Gärbestimmung der abfiltrierten Hefe [1].

Auch Vorquellung in Wasser verkürzt nach ABDERHALDEN [2] die Induktion bei der Gärung von hinzugefügtem Zucker. Trennt man jedoch die Hefe von dem dabei verwendeten Wasser und führt sie in eine Zuckerlösung über, so erzielt man keinen Erfolg, da der Hefe durch diese Vorbehandlung ein großer Teil des Koenzyms entzogen wird [3].

Um das Schicksal des Kohlehydrates während der Inkubation bzw. während der Induktionsperiode kennen zu lernen, wurden Gärungen mit einer lang und scharf induzierenden Trockenhefe angesetzt und in verschiedenen Zeitpunkten unterbrochen. Die Analyse der Restlösung gab größere Abweichungen im Zuckergehalt zwischen der polarimetrischen und reduktometrischen Methode, als man bei Gärungen mit Frischhefe zu finden pflegt. Diese Differenzen gehen auf das Austreten linksdrehender Substanzen aus der Hefe zurück [4]. In welchem Maße beide analytischen Methoden durch Reaktion zwischen Kohlehydrat und Eiweiß [5] verfälscht werden, ist eine ungeklärte Frage, mit der es sich in dem Spezialfall der Trockenhefe [5] nicht anders als sonst verhalten dürfte. Die Ergebnisse dieser Unterbrechungsversuche waren infolge der erwähnten Fehlerquellen nicht einheitlich.

Trotzdem lassen sie erkennen, daß zu Anfang der Induktion im Gärgut Ruhe herrscht. Hierauf beginnt der Zucker zu verschwinden, ohne daß sogleich Kohlendioxyd entwickelt wird. Die Gasentwicklung beginnt meist erst nach einiger Zeit und erreicht um so geringere Beträge, je später sie einsetzt.

Verschwinden von analytisch nachweisbarem Zucker ohne äquivalente Entbindung von CO_2 findet bei jeder Gärung statt. Während aber nach unveröffentlichten Versuchen dieses „Zuckerdefizit" bei frischen Hefen selten 15% der ursprünglichen

[1] Vgl. ABDERHALDEN, a. a. O. S. 146, Versuch 7.
[2] Vgl. ebenda S. 145.
[3] Vgl. H. v. EULER und K. MYRBÄCK, Diese Zs. Bd. 117, S. 28 [1921] und H. v. EULER und S. KARLSSON, ebenda Bd. 123, S. 90 [1922].
[4] R. O. HERZOG und O. SALADIN, Diese Zs. Bd. 73, S. 263, und zwar S. 265 [1911].
[5] N. N. IWANOFF, Biochem. Zs. Bd. 120, S. 1, und zwar S. 51 [1921]; S. KOSTYTSCHEW und W. BRILLIANT, Diese Zs. Bd. 127, S. 224 [1923].

Substratkonzentration erreicht, wird diese Zahl bei Trockenhefegärungen oft überschritten. Da der verschwindende Zucker offenbar dem inneren Stoffwechsel der Zelle dient, so kann der Mehrverbrauch bei den Trockenhefen hinreichend mit deren besonderen Bedürfnissen, der Ergänzung des oft sehr geringen Glykogengehaltes, insbesondere aber mit dem Substanzbedarf zum Aufbau der von Abderhalden festgestellten sprossenden Tochterzellen erklärt werden.

Das Anwachsen des Zuckerdefizits bis 50% bei Vergrößerung (Verdreifachung) der Trockenhefekonzentration zeigt deutlich, daß es sich um einen Kohlehydratverbrauch des Pilzes handelt, nicht um ein bloß zeitweiliges Verschwinden des Zuckers infolge eines abnormalen Gärungsmechanismus.

Die Auffassung, daß die Gärung der Trockenhefe nicht prinzipiell von der Gärung frischer Hefe verschieden ist, wurde durch eine Reihe weiterer Versuche unterstützt: Wenn Trockenhefe auf die am Ende des exp. Teils geschilderte Art und Weise zerrieben wurde, so daß unter dem Mikroskop nur mehr vereinzelte Zellen in unzerstörtem Zustand erkennbar waren, so wies diese Trockenhefe eine viel schlechtere Gärkraft und eine viel längere Induktion als die unzerriebene Hefe auf, ein Resultat, das nicht durch die Gärung mittelst freier Zymase erklärt werden kann. Ein freies Enzym müßte im Gegenteil durch die Zerreißung der Zellen für das Substrat zugänglicher geworden sein. [6] Gegen die Gärwirkung freier Zymase in Trockenpräparaten spricht schließlich gerade die oftmals dafür angeführte Wirkung der Narkotica. In ihrem Verhalten diesen gegenüber steht die Trockenhefe neben der lebenden Hefe, während die freie Zymase des Macerationssaftes große Konzentrationen von Toluol usw. verträgt. Die häufig angegebenen graduellen Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen frischer und getrockneter Hefe beruhen darauf, daß die letztere wegen ihrer geringeren Gärkraft und infolge ihres etwa 4mal so großen Trockengehaltes stets in größeren Konzentrationen angesetzt wird. Da nun alle Zellen, nicht nur die gärfähigen, ihren Anteil an Narkoticum aufnehmen, so wirkt nur der dem Bruchteil an lebenden Zellen proportionale Prozentsatz des Anästheticums der Gärung entgegen, der überwiegende Teil wird von den ohnedies gärungsunfähigen* Zellen adsorbiert bzw. festgehalten. Die Menge des Zellgiftes muß also nicht nach der zu unterdrückenden Gärkraft, sondern nach der bei den Trockenhefegärungen viel größeren Konzentration an Hefetrockensubstanz bemessen werden.

Unter dieser Annahme reicht das auch bei lebender Hefe notwendige Minimum aus. Die Konzentrationen des Antisepticums werden aber meist viel zu niedrig gewählt. Wenn E. Buchner[1] oder neuerdings F. Hayduck und H. Haehn[2] sowie letzterer und H. Schifferdecker 0,2 ccm bzw. 15 Tropfen Toluol auf 2 g Trockenhefe anwenden, so entspricht dies 0,05 ccm Toluol auf 2 g Frischhefe bzw. 0,2 ccm auf 8 g Frischhefe, Bedingungen, unter denen Gärung stattfindet; ein Vergleich mit

* *Im Original steht wohl infolge Druckfehlers „gärungsfähigen".*

[1] Die Zymasegärung, München 1903, S. 271.

[2] Biochem. Zs. Bd. 128, S. 568, und zwar S. 574 [1922]; Bd. 138, S. 209 [1923].

0,2 ccm Toluol auf 1 g lebende Hefe, also gleich viel Toluol auf den 8. oder 10. Teil Trockensubstanz ist irreführend. Auch 5 ccm thymolgesättigtes Wasser auf 25 ccm und 1 g Trockenhefe[3] sind unzureichend.

Es gelang mir stets, Gärung von Trockenhefe, die in einem Parallelversuch erwiesen wurde, durch Zusatz von 1 ccm Toluol [7] pro Gramm Trockenhefe in 20 ccm zu verhindern oder auf die anfängliche Entwicklung von wenigen Prozenten der theoretisch zu erwartenden Kohlensäuremenge zu beschränken.

Eine andere Ursache für Trockenhefegärung in Gegenwart von Zellgiften kann die durch zu große Hefekonzentration ermöglichte Maceration sein, die durch Antiseptica nicht hintangehalten wird (vgl. S. 3, 1. Absatz des Kleingedruckten). Der entstehende Saft beginnt allmählich den Zucker zu vergären, z. B. ergab Acetonhefe bei längerer Inkubation mit der 3fachen und 6,6fachen Wassermenge einen, wenn auch schwachen Lebedewsaft. Wenn man Saft und Rückstand beisammen läßt und dann Zucker hinzufügt, so setzt sich der Gärungsverlauf deutlich aus zwei Komponenten zusammen: einer Saftgärung von ähnlicher Stärke wie in dem Versuch ohne den Rückstand und einer Acetonhefegärung mit ähnlicher Induktionsdauer wie sonst und darauffolgendem steilen Gärungsanstieg.

Vergleicht man das Verhalten der Zymase mit dem der anderen in der Trockenhefe latenten Enzyme, so zeigt sich, daß die Zymase und die der Autolyse dienenden Enzyme nicht sofort in Wirksamkeit treten, sobald die Zelle mit Wasser in Berührung tritt. Die verwickelte Zusammenarbeit dieser Enzymgruppen verlangt einen gewissen Lebensgrad der Zellen, die einfachen biosespaltenden Enzyme und die Carboxylase wirken dagegen, sowie ihnen ihr Substrat zugeführt wird, ohne Abhängigkeit von dem Zustande der übrigen Zellbestandteile. Von den Macerationsenzymen unterscheidet sich die Zymase dadurch, daß sie nicht nur Quellung, sondern auch Ernährung der Zelle fordert, und besonders dadurch, daß ihre Wirkung durch Toluol und ähnliches aufgehoben wird. Diese Empfindlichkeit ist der durch Quellung regenerierten Trockenhefe mit der frischen Hefe gemeinsam und weist auf die Verankerung des Enzyms im Plasma in beiden Fällen hin[1]).

Ein weiteres Argument dafür, daß die Zymase in der Trockenhefe nicht freiliegt, ist der Umstand, daß sie sich nicht [8] ohne weiteres aus jeder Trockenhefe auswaschen läßt, sondern nur aus manchen nach LEBEDEWS Verfahren extrahiert werden kann, nämlich aus jenen Hefen, welche den zur Loslösung des Zymasekomplexes erforderlichen Enzymapparat besitzen.

Die zu einfache Buchnersche Annahme einer freien Zymase in der lebenden Zelle, die nach Zerreißung derselben einfach in Lösung geht, ist heute allseits verlassen und die von R. WILLSTÄTTER ausgesprochene Erkenntnis, daß das Invertin, welches man früher für löslich hielt, erst enzymatisch freigelegt werden muß[1]), legt einen

[3] H. v. EULER und S. KULLBERG, Diese Zs. Bd. 73, S. 92 [1911].

[1]) Vgl. EULER, Chemie der Enzyme, 2. Aufl. 1921, I, S. 164: „Gegen Antiseptica sind die Hefenenzyme in dem Maße unempfindlich, als sie vom lebenden Plasma befreit sind."

[1]) R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Liebigs Ann. der Chem. Bd. 427, S. 111 [1921/22].

Analogieschluß für die Zymase nahe. Während aber das Invertin trotz seiner Bindung an das tote Plasma gewisser Trockenhefen wirkt, ist die Zymase infolge ihrer verwickelten Zusammensetzung in ihren Bedingungen wählerischer. Nur einzelne ihrer Komponenten, z. B. die Phosphatese, falls man diese als Bestandteil des Gärsystems gelten lassen will, sind gleich der Saccharase schon in dem latenten Lebenszustand der ausgetrockneten Zelle wirksam.

Wenn H. v. EULER und B. AF UGGLAS[2] schreiben:

„. . . die Zymase ist in der lebenden Hefezelle als Komplex ganz oder teilweise an das Protoplasma gebunden; wird die vitale Tätigkeit der Zelle dauernd oder zeitweilig aufgehoben, so wird auch die gärungserregende Gruppe des Protoplasmas, also die an das Protoplasma gebundene Zymase, inaktiviert; wirksam bleibt nur derjenige Teil des Gärungsenzyms, welcher frei ist, oder bei der Entwässerung im Vakuum oder durch Alkohol freigemacht wird. . ."

—, so entspricht die erste Möglichkeit dieser Alternative der Wirklichkeit: Die Zymase ist ganz an das Plasma gebunden. Die gezwungene Annahme eines gleichzeitigen zwiefältigen Zustandes der Zymase in der Zelle erscheint als ein Kompromiß zwischen der neueren Erkenntnis und der veralteten Buchnerschen Theorie.

Was den Nachsatz über die Freimachung des Gärungsenzyms bei der Entwässerung betrifft, so wird diese von EULER [9] auch an anderer Stelle geäußerte Anschauung[1]) häufig in der Literatur angetroffen. Es ist jedoch schwer vorstellbar, daß die Zymase innerhalb der kurzen Zeitspanne, während deren die plötzliche Fixierung der Zelle bei den angewandten scharfen Methoden (Aceton, Krauseapparat) eintritt, vom Plasma abgelöst wird. Aber auch bei der langsam verlaufenden Trocknung nach A. v. LEBEDEW ereignen sich nur Vorgänge vorbereitender Natur. Sie dienen bloß der Konservierung

sollte auf die zellfreien Säfte beschränkt werden und man muß letzterem Forscher darin beistimmen, daß „die Leistung der Trockenhefe ausschließlich auf lebende Zellen zurückzuführen ist."

[10] Das Zymasesystem innerhalb der Zelle wirkt, sei es mechanisch oder chemisch an das Plasma gebunden und zwar derart gebunden, daß seine einzelnen Komponenten an jener Stelle des Zellkörpers verankert und lokalisiert sind, wo das Milieu — Acidität, Lage der adsorptionsfähigen Gruppen des Plasmas usw. — ihnen speziell günstig und durch die osmotischen Verhältnisse der Umsatz der Zwischenprodukte, wie in einem Betrieb mit Arbeitsteilung, passend organisiert ist[1]. Werden diese organischen Zusammenhänge durch gewaltsame Eingriffe zerstört, so wäre die Wirkung selbst dann auf einen Bruchteil reduziert, wenn alle Enzymkomponenten in unbeschädigtem Zustande in ursprünglicher Menge vorhanden wären, wie dies in einem idealen Macerationssaft der Fall sein müßte, der dennoch nie die Menge frischer Hefe, aus welcher er gemacht wurde, ersetzen können wird. Bei der Trockenhefe ist diese geordnete Funktion der organisierten Zymase durch den Wassermangel lahmgelegt und sicherlich ein gewisser Teil des Enzymbestandes irreversibel zerstört. Da der Zellinhalt aber im trockenen Zustand fixiert ist, kann es nicht einmal zu einer zwar geschwächten und ungeordneten, aber wenigstens freien Kooperation der Teilenzyme kommen. Deshalb kann Trockenhefe als solche nicht gären.

Experimenteller Teil.

Hefetrocknung.

Um die Gärungen verschiedener Trockenhefen, deren Unterschiede und deren Gemeinsamkeiten kennen zu lernen, verglich ich eine Brauerei- mit einer Bäckereihefe und variierte die Bedingungen der Trocknung in weitgehendem Maße. Es gelangte Unterhefe von der Münchener Löwenbrauerei zur Verwendung, ferner käufliche Bäckerhefe von Sinner A.-G. in Grünwinkel b. Karlsruhe, sowie ein „Florylin" genanntes Trockenpräparat.

[11] Die untersuchten Trockenhefen wurden nach den folgenden Methoden dargestellt:

Die Hefen Nr. 3, 3a, 4 und 6 wurden in etwa 5 mm hoher Schicht auf poröser Unterlage (Filtrierpapier; vgl. F. Hayduck und O. Bulle[1]) ausgebreitet, 3 und 3a bei Zimmertemperatur, 4 und 6 bei einer Temperatur von 30 bis 35°. Die Trocknung erforderte 48 bis 72 Stunden. Die Temperatur der Trocknung scheint für die Gärkraft der Trockenhefe nicht so wesentlich zu sein, wie sie es für die Gärkraft der aus den Trockenhefen bereiteten Macerationssäfte ist.

Die Hefen Nr. 5 und 5a wurden im Faust-Heimschen Apparat 6 Stunden lang einem lebhaften Luftstrom von 28 bis 35° ausgesetzt. Die Trocknung war nicht sehr

[1] Eine ähnliche Anschauung äußerten kürzlich H. Haehn und H. Schifferdecker, a. a. O. S. 264.

[1]) Wochenschr. f. Brauerei Bd. 29, S. 489 [1912].

radikal, so daß die Hefe nach einigen Wochen einen säuerlichen, verdorbenen Geruch aufwies. Bei manchen Acetonhefen wiederholte sich diese Erscheinung.

Die Hefen Nr. 7 und 8 konnten dank dem freundlichen Entgegenkommen der Versuchsanstalt der Krause A.-G. in München unter der Leitung von Dr. SIEGENS nach dem Krauseverfahren getrocknet werden[2]. Bei einem Versuch wurden beispielshalber 3 kg Hefe von 30% Trockengehalt mit Wasser auf 18 l verdünnt, diese 5proz. Lösung wurde im Verlauf von etwa 4 Stunden in die durchschnittlich 50grädige Luft der Trockenkammer zerstäubt.

Zur Darstellung von Nr. 9 wurden 500 g Frischhefe innerhalb 20 Minuten mit 4 l Aceton versetzt, so daß dessen Konzentration bei der Vermischung mit dem Zellsaft erst allmählich wuchs. Das hellgelbe Produkt wurde abgenutscht, mit Äther gewaschen und in dünner Schicht auf Filtrierpapier getrocknet. Die Dauer der Acetonbehandlung erwies sich als irrelevant.

Nr. 9a. Um noch milder zu verfahren, wurde die Hefe vor dem sukzessiven Acetonzusatz mit Wasser auf das Doppelte verdünnt und so leichter durchmischbar gemacht.

Weniger schonungsvoll als diese beiden Darstellungsweisen [12] ist die Vorschrift von R. ALBERT, E. BUCHNER und R. RAPP[1]), nach welcher die Trockenhefe Nr. 10 dargestellt wurdn. Die Hefe wurde sofort in den 6- bis 10fachen Überschuß von Aceton eingetragen. Die Gärung mit Hefe 9 und 9a weist keinen erheblichen Unterschied auf, dagegen ist die Differenz zwischen 10 und 9 deutlich wahrnehmbar.

Nr. 11, „Florylin", wird nach dem Olhaverschen[2]) oder einem ähnlichen technisch gebräuchlichen Verfahren hergestellt. Das Präparat war 7 Jahre alt.

Mangelhafte Zerteilung der Frischhefe führt bei den langsameren Trockenmethoden (Nr. 3 bis 6) zur Knollenbildung. Innerhalb einer schnell getrockneten Kruste entstehen autolytische Herde, da das eingeschlossene Wasser nicht abziehen kann, und so bildet sich ein heterogenes, zum Teil enzymatisch „angeätztes" Produkt; durch Absieben der größeren Knollen kann dies einigermaßen gutgemacht werden.

Um eine feine Verteilung der Hefe zu erreichen, wurde versucht, die Hefe, wie es H. P. BARENDRECHT[3]) empfiehlt, mit Kieselgur zu verdünnen (Nr. 3a und 5a). Diese Behandlung zeitigte keinen einheitlichen Erfolg. Allzu feine Verteilung der Hefe, wie sie beim Krauseverfahren erzielt wird, beeinträchtigt die Haltbarkeit, da die große Oberfläche Oxydation und Feuchtigkeitsaufnahme begünstigt.

Gärbestimmung.

Der Verlauf der Gärung wurde volumetrisch nach den Angaben von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[4]) beobachtet. Die Gärkölbchen wurden in einer mittels Wasserturbine betriebenen Schüttelvorrichtung in einem Thermostaten von 30 ± ½° befestigt. Gummischlauch wurde im Vakuum mit geschmolzenem Paraffin imprägniert. Mit einem möglichst kurzen Stück davon wurde das Gärkölbchen und das Queck-

[2] Zs. f. angew. Chem. Bd. 35, S. 533 [1922].
[1]) Chem. Ber. Bd. 35, S. 2376 [1902]. [2]) D. R. P. 257176.
[3]) Zs. physikal. Chem. Bd. 49, S. 465 [1904].
[4]) Diese Zs. Bd. 115, S. 211, und zwar S. 222 [1921] (*Abh. 63*).

silbergasometer verbunden. Dessen Überlaufvorrichtung war [13] durch ein Gewinde genau auf den Quecksilberspiegel des Hauptgefäßes einstellbar, so daß die Ablesungen auf $\pm ^1/_2$ ccm genau waren.

Das theoretisch mögliche Volumen CO_2 wurde jeweils aus Druck und Temperatur berechnet und schwankte in engen Grenzen um einen Mittelwert von 290 ccm aus 1 g Hexose. Die von WILLSTÄTTER und STEIBELT gegebene Definition der „Halbgärzeit"[1] wurde dem vorliegenden Thema durch Verfünffachung der angewandten Hefentrockensubstanz von 0,2 g auf 1,0 g angepaßt. Diese Menge Trockenhefe wird mit 1 g Zucker in 20 ccm CO_2-gesättigten Wassers zur Reaktion gebracht.

Um diesen Gäransatz zu den quantitativen Angaben der Literatur über Trockenhefegärung in Beziehung zu setzen, sei folgendes angeführt: Bei den von E. BUCHNER[2] am häufigsten angewandten Proportionen — 4 g Trockenhefe, 8 g Rohrzucker, 20 ccm H_2O — ist die hohe Zuckerkonzentration der Gärung abträglich[3]. Es kann bei diesem Ansatz nie zu einer vollständigen Vergärung des Substrates kommen und so begnügt sich dieser Autor mit der Angabe des Gesamtumsatzes nach 1, 2, 3 . . . Tagen; es erscheint indessen vorteilhafter, Enzymmengen mittels der Umsatzgeschwindigkeit, nicht mittels des Gesamtumsatzes zu messen[4]. Überdies sind große Hefenkonzentrationen nicht geboten, da sie bereits die Maceration begünstigen; dieser Effekt nimmt mit der Hefenkonzentration schnell zu, wie A. v. LEBEDEW für die Ansätze 1:6 bis 1:2,5 zeigt. Dieser schwer kontrollierbare Einfluß bleibt am besten dadurch ausgeschaltet, daß man nie mehr als 10% Hefe anwendet.

Zur technischen Triebkraftbestimmung[5], die allerdings, wie der Name aussagt, kein Maß der Gärung allein bringen will, [14] sei bemerkt, daß zu kleine Hefemengen infolge ihrer starken Vermehrung die Hefekonzentration zu einem inkonstanten Faktor machen. Immerhin ergibt diese Bestimmung ein besseres Fermentmaß als die Buchnersche, indem sie den Umsatz in einem enger begrenzten Zeitraum (2 bis 6 Stunden) zur Grundlage hat.

Am besten sind die Versuchsansätze von H. v. EULER[1]) und von E. ABDERHALDEN[2]) mit den vorliegenden vergleichbar. Die kontinuierliche Beobachtung in diesen Serien gestattet auch die Konstruktion von Gärungskurven und die Interpolation von Induktionsperioden. Hierdurch wird die hier vorgeschlagene doppelte Charakterisierung von Trockenhefen ermöglicht.

[1] a. a. O. S. 219.

[2] E. u. H. BUCHNER und M. HAHN, Die Zymasegärung, München 1903; vgl. auch F. HAYDUCK und H. HAEHN, Biochem. Zs. Bd. 128, S. 568 [1922].

[3] Vgl. A. SLATOR, Journ. Chem. Soc. Bd. 89, S. 128 [1906].

[4] A. v. LEBEDEW, Ann. Inst. Past. Bd. 26, S. 8, und zwar S. 13 [1912].

[5] Nach F. HAYDUCK und M. BULLE, Wochenschr. f. Brauerei Bd. 29, S. 489 [1912]: (ebenso wie der Buchnersche Ansatz zum Vergleich auf 20 ccm umgerechnet) 0,2 g Trockenhefe gegen 2 g Zucker.

[1]) H. v. EULER und S. KULLBERG, Diese Zs. Bd. 73, S. 92 [1911]: 0,25 und 1,0 g Trockenhefe; 1 und 2 g Zucker. — H. v. EULER und K. MYRBÄCK, Diese Zs. Bd. 117, S. 27 [1921]: 0,1 bis 0,8 g Trockenhefe, 0,8 g Zucker.

[2]) E. ABDERHALDEN und A. FODOR, Fermentforschung Bd. 5, S. 138, und zwar S. 147 [1921]: 0,4 und 0,8 g Trockenhefe gegen 0,8 und 1,6 g Zucker (alles auf 20 ccm bezogen).

Um eine Gärung frischer Hefe mit einer nach der veränderten Halbgärzeitsdefinition angesetzten Trockenhefegärung in Beziehung zu bringen, mußte die sonst angewandte Menge von 1,00 g lebender Hefe von 20 bis 30 % Trockengehalt ungefähr vervierfacht werden. Zwischen diesen Konzentrationen ist die Gärkraft der Fermentmenge noch proportional, wie der folgende „Brücken"versuch zeigt:

Löwenbräuhefe (26½ % Trockengehalt) 1 g Glucose, 20 ccm, 30°.

Hefe frisch	Trockensubstanz	Minuten						
		5	15	25	30	40	50	150
0,76 g	0,20 g	7	16	24	29	38	46	**145** ccm CO_2
3,78 g	1,00 g	24	70	120	**147**	197	230	234 ccm CO_2

Halbgärzeit 150 Minuten, für die fünffache Konzentration der Trockenhefedefinition 30 Minuten = $^1/_5$ hiervon.

Als Substrat gelangte stets Glucose zur Verwendung, um die enzymatische Reaktion möglichst einfach zu gestalten.

Der Gärungsverlauf.

Wenn man die Kohlensäureentbindung bei einer Trockenhefegärung graphisch darstellt, so erkennt man, wie unzureichend [15] die Angabe der Halbgärzeit wäre. Nun folgt auf die Dauer der Induktionsperiode nicht bei allen Hefen so unmittelbar ein linearer Gärungsanstieg, daß man beide Daten ohne weiteres beobachten und vergleichen könnte. Dagegen erwies es sich als durchführbar und als geeignet, die Kurven graphisch zu extrapolieren, indem an die Gärungskurve in ihrem steilsten Abschnitt eine Tangente gelegt wird. Deren Neigung ist ein Maß der maximalen Gärgeschwindigkeit. Der Abszissenabschnitt von $t = 0$ bis zum Fußpunkt dieser Tangente auf der Abszissenachse gibt die extrapolierte Induktionsperiode. Unter Verzicht auf eine graphische Darstellung mag man als gutes Maß der endgiltigen Gärgeschwindigkeit das Fünffache jener Zeitdauer verwenden, welche die Hefe zur Vergärung von 10 % der Anfangskonzentration des Substrats benötigt, sobald die Gasentwicklung am lebhaftesten ist. Die Gesamthalbgärzeit, verringert um diese reduzierte Halbgärzeit, ergibt übereinstimmend mit der graphischen Methode die extrapolierte Induktionsperiode.

Für die zahlreichen Gärungen, die mit den oben beschriebenen und mit ähnlichen Präparaten angestellt wurden, geben die folgenden Tabellen und Diagramme charakteristische Beispiele. Außer den Daten der volumetrischen Beobachtung finden sich für jeden Versuch 1. die extrapolierte Induktionsdauer, 2. die reduzierte Halbgärzeit, 3. die Summe dieser beiden: die Gesamthalbgärzeit, und 4. die Ausbeute in Prozenten, berechnet aus dem Quotienten $\frac{\text{reduzierte Halbgärzeit}}{\text{Halbgärzeit der Frischhefe}}$.

Tabelle 1. Gärung mit frischer Hefe.

	1. Löwenbrauereihefe	2. Sinnerhefe
CO_2 in ccm nach 15 Minuten	70	28
30 ,,	147	70
50 ,,	230	145
150 ,,	235	230
Halbgärzeit	30 Minuten	50 Minuten — 10 Minuten extrapol. Induktion 40 Minuten reduz. Halbgärzeit

[16] Tab. 1 gibt normal verlaufene Gärungen der beiden Ausgangsmaterialien für diesen Vergleich. Die Bäckereihefe ist infolge der zweitägigen Lagerung ein wenig erschöpft und erreicht erst nach einer kurzen Induktion von 10 Minuten ihre volle Gärkraft.

Tabelle 2. Trockenhefegärungen.

Hefe	Nr. 3	3a	4	5	5a	6
	Löwenbrauereihefe					Sinnerhefe
Trocknung	20°	20° (Kieselg.)	35°	Faust-H.	Faust-H. (Kieselg.)	35°
ccm entwickeltes CO_2 nach 100 Minuten	18	24	40	28	26	4
200 ,,	57	64	104	72	68	22
250 ,,	79	91	132	111	93	53
300 ,,	102	122	160	168	128	85
350 ,,	123	150	175	212	166	120
400 ,,	142	175	191	221	202	167
460 ,,	—	—	—	—		244
520 ,,	220	212	256	236	228	255
extrapol. Induktion (in Minuten)	80	110	25	155	130	260
reduzierte Halbgärzeit (in Minuten)	330	230	250	125	190	115
Gesamt-Halbgärzeit (in Minuten)	410	340	275	280	320	375
Ausbeute	9 %	12 %	12 %	24 %	16 %	35 %

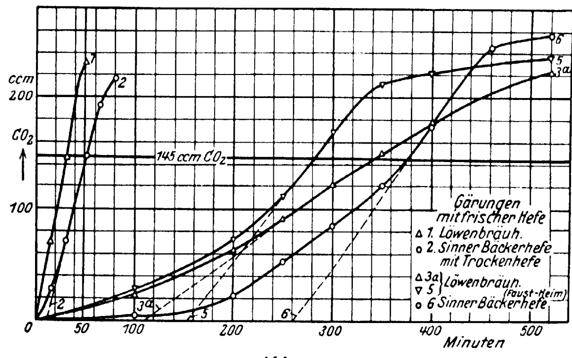


Abb. 1.

[17] Die Gärungen der Tab. 2 sind in Abb. 1 zum Teil graphisch wiedergegeben. Die punktierten Linien dienen der Extrapolation der Induktionsperiode. Die Abweichung der tatsächlichen Gärungskurve von dieser Geraden wechselt aus den früher angeführten Gründen. Die getrocknete Bäckereihefe Nr. 6 ist mit der Brauereihefe Nr. 4 vergleichbar.

Tabelle 3. Weitere Trockenhefegärungen.

	Stunden	Nr. 7 Löwenbräu (Krause)	Stunden	8 Sinner (Krause)	9 Löwenbrauereihefe (milde Acetonbehandlung)	9a Löwenbrauereihefe (milde Acetonbehandlung)
CO_2 in ccm nach			5	7	3	15
	4	36	8	—	5	24
			15	—	34	55
	4½	54	17	24	59	79
			18	—	98	
	5	105	19	—	149	150
			20	45	188	209
	5½	157	22	80	208	—
			24	135	—	—
	8	235	28	192	-	—
in Minuten	extrapol. Induktion	240	—	1160	970	990
	reduzierte Halbgärzeit	85	—	310	170	150
	Gesamt-Halbgärzeit	325	—	1470	1140	1140
	Ausbeute	35 %	—	13 %	18 %	20 %

Die Hefen mit längerer Induktion sind in die Tab. 3 und 4 und in die Abb. 2 aufgenommen. Auch hier entspricht einer Bäckereihefe (Nr. 8) eine auf die gleiche Weise getrocknete Brauereihefe (Nr. 7), jedoch war die letztere im Krauseapparat keiner so hohen Temperatur ausgesetzt gewesen und zeigt darum besonders gute Gärkraft und relativ kurze Induktionsdauer.

Für die beiden Hefen der Tab. 4 wurde wegen ihrer vielstündigen Induktion der Verlauf der Gärung in den ersten [18] 25 Stunden nach Ansatz des Versuches

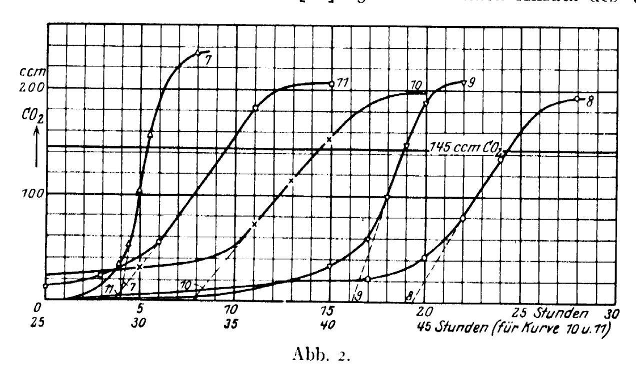


Abb. 2.

in der Abbildung nicht wiedergegeben. Die Kurvenäste wurden um die entsprechende Strecke der Abszisse nach links verschoben und sind auf die untere Zeitskala der Abb. 2 zu beziehen.

Tabelle 4. Trockenpräparate mit langer Induktionsdauer.

	Nr. Hefe	10 Acetonhefe nach ALBERT und BUCHNER	11 „Florylin"
CO_2 in ccm nach	5 Std.	4	2
	25 „	—	15
	28 „	—	24
	30 „	31	44
	31 „	—	56
	35 „	53	159
	36 „	73	183
	38 „	115	—
	40 „	155	206
	45 „	198	—
extrapol. Induktion	in Minuten	1970	1710
reduzierte Halbgärzeit	in Minuten	400	360
Gesamt-Halbgärzeit	in Minuten	2370	2070
Ausbeute		8 %	?

[19] Unterbrechungsversuche.

Bei Gärungsversuchen, in denen der Zucker des Gärgutes analysiert werden sollte, wurde gleichzeitig mit der Gärprobe ein etwa 5facher Ansatz gleicher Konzentration in den Schüttelthermostaten gebracht. In den gegebenen Zeitpunkten wurden aliquote

Tabelle 5.

Hefe	Dauer in Stunden	CO_2 ccm	CO_2 %	Zuckergehalt α_D (l = 2 dcm)	Zuckergehalt %	Zuckerdefizit %
1. Nr. 10	0	0	0	5,30°	100	0
	8	0	0	5,30°	100	0
	21	85	29	1,65°	31	40
				Bertr.	29	42
	∞*	226	78	Bertr.	0	22
2. „ 9a	17	26	9	4,76°	90	1
	24	69	21	3,97°	76	3
	40	107	37	0,79°	15	48
	41,5	140	49	—	—	—
	∞*	233	80	0	0	20
3. „ 9	14,5	63	22	Bertr.	61	17
(3fache Hefekonz.)	44	130	45	— 2,0°	?	—
	∞*			Bertr.	5	50
4. ebenso (23°)	14,5	28	10	—	—	—
	44	90	31	— 0,87°	?	—
	∞*			Bertr.	21	48

* ∞ = konstanter Endwert.

Volumina entnommen, zur Sistierung der Gärung von der Hefe abfiltriert, schnell geklärt und darauf reduktometrisch nach BERTRAND und polarimetrisch analysiert. In den letzten 2 Versuchen der Tab. 5 kam die dreifache Hefemenge zur Anwendung, in den ersten beiden die normalen Konzentrationen, je 1 g Trockenhefe und Glucose auf 20 ccm Wasser. Alle Versuche außer dem letzten bei 30°.

Aus den CO_2-Mengen der 3. und 4. Spalte und dem Zuckergehalt der Restlösungen (5. und 6. Spalte) errechnet sich das „Zuckerdefizit". Während in den ersten beiden Versuchen nur 20 bzw. 22% endgültig der alkoholischen [20] Vergärung entzogen bleiben, wächst bei Vergrößerung der Hefekonzentration dieser Betrag bis auf 50% —Zuckermengen, die in beiden Fällen 1/5 bis 1/6 der vorhandenen Hefetrockensubstanz ausmachen. Durch heftiges Schütteln wurde die Möglichkeit ausgeschaltet, daß dieser Effekt durch CO_2-Retention vorgetäuscht würde. Auch eine Alkalisierung des Gärgutes, welche Kohlensäure verschwinden ließe, kommt nicht in Betracht. Es bleibt also nur die eingangs gemachte Annahme übrig, daß die Trockenhefe in noch größerem Umfang als die frische Hefe einen Teil des dargebotenen Kohlehydrates als Aufbausubstanz verwendet und ihn der Gärung entzieht.

Induktion und Hefekonzentration.

Aus dem folgenden Versuch ergibt sich, entsprechend den im theoretischen Teil gezogenen Schlüssen, daß die Dauer der Induktion von der Hefekonzentration abhängt.

	Hefe	Glucose	ccm CO_2 nach 2	3	18,5	42,5 Std.
1.	1 g	1 g	0	0	10	169
2.	2	1	5	12	76	187
3.	3	1	23	43	156	177
4.	1	0,5	0	0	5	72
	ber. f. 1 g Gluc.)				(10)	(144)

Und zwar wird durch die Steigerung der Hefekonzentration die Induktionsperiode verkürzt; es kommt schneller zur Bildung der erforderlichen Menge gärfähiger Zellen.

Daß hierfür weder die Zuckerkonzentration noch deren Verhältnis zur Hefenmenge von Bedeutung ist, und daß es bloß auf die absolute Konzentration der Hefe ankommt, zeigt der 4. Versuch der wiedergegebenen Serie. Die lange Induktion entspricht dem 1. Versuch, der mit der gleichen Hefenkonzentration gemacht wurde, nicht dem 2., mit dem der 4. Versuch im Verhältnis Hefe: Zucker (2: 1) übereinstimmt.

Inkubation.

1 g Hefe Nr. 4 wurde zur Gärung angesetzt, jedoch nach 3 Stunden abzentrifugiert. Der erhaltene Bodensatz wurde quantitativ in eine frische Zuckerlösung gebracht. Als Kontrolle wurde eine normale Gärung mit derselben Hefensorte angesetzt.

[21] CO_2-Entwicklung in ccm

nach	9,5	17	18,7	33 Std.
Inkubierte Hefe . .	96	174	195	225
Kontrollversuch . .	60	108	132	232

Dieser Versuch zeigt, welchen Vorsprung die Hefe durch Vorbehandlung mit Zuckerlösung gewinnt.

Zerreibung.

Getrocknete Löwenbräuhefe vom Typus der Hefe Nr. 4 wurde 2 Stunden lang mit der 5fachen Menge Seesand im Mörser zerrieben, so daß im Mikroskop nur mehr vereinzelt Zellen im unzerstörtem Zustand erkennbar waren. Die Gärung dieser zerriebenen Hefe wurde mit einer Gärung derselben Hefe in unzerriebenem Zustand (unter Zusatz der entsprechenden Menge Seesand) verglichen. Die beschädigte Hefe erreichte infolge ihres viel geringeren Gehaltes an lebensfähigen Zellen erst nach einer Zeit Gärkraft, während der die normale Trockenhefe bereits allen dargebotenen Zucker vergoren hatte.

Beispiel: 1 g Hefe, 5 g Seesand, 20 ccm 5proz. Glucoselösung.

ccm CO_2 nach	14	16,5	21 Stunden
zerrieben	74	130	235
unzerrieben	223	–	—

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Geheimrat Prof. R. Willstätter, in dessen Laboratorium diese Arbeit im Herbst 1921 ausgeführt wurde[1], danke ich für das Interesse und die Förderung, die er mir bei diesen Versuchen angedeihen ließ.

[1] Dissertation, München 1922.

Zeitschrift für physiologische Chemie **145**, S. 91 [1925].

72. BEMERKUNGEN ZUR KENNTNIS DER TROCKENHEFE.

Von HARRY SOBOTKA.

(Der Redaktion zugegangen am 2. April 1925.)

In einer kürzlich erschienenen Arbeit „Zur Kenntnis der Trockenhefe, II“[1] erinnert H. v. EULER daran, daß er zuerst 1911 den Gedanken der vollkommenen oder teilweisen Bindung der Zymase an das Protoplasma der lebenden Hefe ausgesprochen hat. Dies sollte in einer Arbeit „Zur Kenntnis der Trockenhefe“[2], auf die EULER anspielt, nicht bestritten werden.

Dagegen glaube ich den Nachweis für die enger umschriebene Annahme erbracht zu haben, daß die Zymase wirklich ganz und nicht nur partiell mit dem Plasma verbunden ist und daß sie erst bei der Darstellung zellfreier Säfte, nicht aber bereits bei der Wasserentziehung, enzymatisch freigelegt und löslich gemacht wird.

Wenn man auf den Gehalt der lebenden Zelle an freier Zymase aus der Gärkraft des Buchnersaftes schließen wollte[3], müßte man konsequenterweise e minore auch Säfte von großer Gärkraft z. B. den durch die folgenden Zahlen charakterisierten Saft mit der ursprünglichen Anwesenheit freien Enzyms erklären, dessen Menge 1 % der gesamten Zymase weit übersteigt und kaum als unbeträchtlich bezeichnet werden kann.

[92]

Gärung von je 1 g Glucose bei 30°.
A. 1 g Hefe (0,23 g Trockengewicht) in 20 ccm; B. 20 ccm Saft, entsprechend 6,67 g Trockenhefe.

Minuten	20	30	45	60	70	115	Halbgärzeit
ccm CO_2 A.	—	37		—	89	**145**	115 Minuten
ccm CO_2 B.	0	25	70	112	**140**	240	70—20 (Induktion) = 50 Min.

Zymaseausbeute des Saftes bezogen auf frische Hefe

$$\frac{115 \times 0,23}{50 \times 6,67} = 7,9\,\% .$$

Schon BUCHNER hat angesichts der steigenden Zymaseausbeuten bei wiederholter Extraktion des Preßkuchens die Möglichkeit ins Auge gefaßt, „daß nicht alle in den Hefezellen befindliche Zymase sich dort in gelöster Form im wäßrigen Zellsaft vorfindet, sondern vielleicht erst infolge des Wasserzusatzes in Lösung geht“[1]). Leider führte der Versuch einer ähnlichen fraktionierten Gewinnung größerer Zymaseausbeuten aus Lebedewmacerationen nicht zum Ziel, da hier jenes die Zymase „freilegende“ Enzym scheinbar vollkommen in Lösung ist und darum bereits zugleich mit dem ersten Saftanteil abgetrennt wird.

Dessenungeachtet bestehen die übrigen experimentellen Gründe fort, auf denen nicht nur der Zweifel an der Existenz freier Zymase in der Zelle, sondern auch die

[1] H. v. EULER und G. WESTLING, Diese Zs. Bd. 140, S. 164 bis 176 [1924].
[2] H. SOBOTKA, Diese Zs. Bd. 134, S. 1 bis 21 [1923/24].
[3] H. v. EULER und G. WESTLING, a. a. O., S. 166.
[1]) „Die Zymasegärung“ 1903, S. 88 bis 92.

Auffassung fußt, daß kein prinzipieller Unterschied zwischen der Gärung frischer und getrockneter Hefe besteht. Abgesehen von den Erfahrungen mit der Induktionsdauer der verschiedenartig getrockneten Hefen, sei auf das aufschlußreiche Verhalten zerriebener Trockenhefe hingewiesen, deren Gärkraft durch die Zerstörung der Zellen eindeutig geschädigt wird[2]. Daß die Trockenhefe bei der Quellung nicht in allen Fällen mit der Wiederaufnahme ihres Stoffwechsels ihre Fortpflanzungsfähigkeit sogleich in experimentell wahrnehmbarem Umfange wieder ausübt, ist kein [93] Widerspruch zu den Erfahrungen der Biologie an lebenden Zellen.

Um eine mißverständlichen Deutung meiner Ausführungen über die Wirkung von Zellgiften auf trockene Hefezellen[1]) zu vermeiden, sei bemerkt, daß der direkte Vergleich der hemmenden Wirkung gleicher Mengen Narkoticum, z. B. Phenol[2]) auf 1 g Trockenhefe und auf 1 g oder 0,25 g Frischhefe (von einem durchschnittlichen Trockengehalt von 25%) unstatthaft erscheint, worauf schon seinerzeit hingewiesen wurde. EULER bemerkt mit Recht auf S. 169 der erwähnten Arbeit, daß die Trockenhefezellen wohl nicht durch „kleinere Permeabilität der äußeren Schicht" geschützt sind. Wenn man nun annimmt, daß das Narkoticum seine Wirkung durch Sorption an oder Reaktion mit den Zellbestandteilen ausübt, so muß man EULER beistimmen, daß der zu erwartende „Unterschied in der Verteilung des Phenols zwischen Zellen und Lösung kaum zu einer höheren Giftkonzentration in der Trockenhefe führen" kann, wohl aber unter sonst gleichen Bedingungen angesichts der viel größeren Trockensubstanzmenge in seinen Versuchen zu einer viel geringeren Giftkonzentration und darum zu schwächerer Gärungshemmung. Ein Blick auf die Eulerschen Zahlen zeigt bei Anwendung von

0,02 g Phenol auf 1 g Trockenhefe eine durchschnittliche Hemmung um etwa 1/4,
0,05 g „ „ 1 g Trockenhefe eine solche von 60 bzw. 20 und 3%,
0,05 g „ „ 1 g frische Hefe (etwa 0,25 g Trockensubstanz) um etwa 4/5,
0,05 g „ „ 0,25 g frische Hefe (etwa 0,0625 g Trockensubstanz) um 5/6 gegenüber den entsprechenden Kontrollversuchen.

Diese graduellen Unterschiede der hemmenden Wirkung sind leicht und hinreichend mit den von 2 bis 80% der Trockensubstanz wechselnden Phenolmengen erklärbar.

Daß auch bei den Versuchen, die alkoholische Gärung durch Zusatz von Formiat zu beschleunigen, die Trockenhefe zurückzustehen [94] scheint[1]], mag seinen Grund ebenfalls darin haben, daß 1 g frischer Hefe mit 2 g getrockneter verglichen wird. Auch in dieser Versuchsserie wird, bei Annahme einer gleichmäßigen Verteilung des Formiates auf die Zellen, der lebenden Zelle etwa die 8fache Menge des Reagens dargeboten.

M. E. lassen sich aus solchen Zahlen keine Schlüsse auf die geringere Empfindlichkeit des Gärvermögens von Trockenhefe gegen verschiedene Reagenzien und somit auf die Verschiedenartigkeit ihres zymatischen Systems ziehen.

New York, den 17. März 1925.

---

[2] H. SOBOTKA, a. a. O. 2, und zwar S. 5 u. 21.
[1]) A. a. O., S. 6. [2]) H. v. EULER und G. WESTLING, a. a. O., und zwar S. 167 bis 169.
[1]] A. a. O., S. 173f.

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft **57**, S. 1852 [1924].

73. EINFLUSS DER ACIDITÄT BEI EINWIRKUNG VON HEFE-AUSZÜGEN AUF KONZ. TRAUBENZUCKERLÖSUNGEN.

Von RICHARD KUHN und GEORG ERNST V. GRUNDHERR.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Eingegangen am 8. September 1924.)

Das synthetische Wirkungsvermögen der Enzyme ist von A. CROFT HILL [1] am Beispiel der Einwirkung von Hefe-Auszügen auf Glucose entdeckt worden. Die Natur des gebildeten Disaccharids ist aber noch umstritten. Ursprünglich glaubte CROFT HILL, daß das Reaktionsprodukt Malzzucker sei. Wir halten seine diesbezügliche Schlußfolgerung nicht nur mit Rücksicht auf die Isolierung von Maltosazon, sondern auch im Hinblick auf die Übereinstimmung der Reduktions- und Drehungswerte, die sich von Glucose einerseits, von Maltose andererseits ausgehend ergeben, für überzeugend. Nach O. EMMERLING [2] soll dagegen kein Malzzucker, sondern Isomaltose gebildet werden, und in einer späteren Mitteilung spricht sich A. CROFT HILL [3] für die gleichzeitige Entstehung zweier Disaccharide, Maltose und Revertose, aus.

Wir haben die Versuche CROFT HILLS von neuem in Angriff genommen in der Absicht, die präparative Methodik durch Berücksichtigung der von R. WILLSTÄTTER [4] bei der Darstellung von Maltase-Lösungen aus Frisch-Hefe gemachten Erfahrungen zu verbessern und unsere Kenntnisse in kinetischer Hinsicht durch Berücksichtigung der Wasserstoffzahl im Sinne von S. P. L. SOERENSEN [5] zu vertiefen.

Zur Lösung der eingangs erwähnten Widersprüche glauben wir durch die Feststellung beitragen zu können, daß bei wechselnder Acidität zwei Maxima für die Geschwindigkeit der Reduktionsabnahmen zu beobachten sind. Mit Auszügen aus Löwenbräu- und Sinner-Hefe fanden wir ein Maximum zwischen p_H 4 und p_H 6, gefolgt von einem Minimum bei p_H 6,5 bis 6,8 und einem zweiten Optimum bei p_H 7,3 bis 7,5 (Abb. 1). Die starke p_H-Abhängigkeit der Reduktionsabnahmen macht es verständlich, daß die von früheren Forschern benützten Hefe-Auszüge, die gegen Lackmus neutral reagierten, bald das eine, bald das andere Disaccharid in über-

[1] Soc. **73**, 634 [1898]. [2] B. **34**, 600, 3810 [1901]. [3] Soc. **83**, 578 [1903].
[4] R. WILLSTÄTTER, G. OPPENHEIMER und W. STEIBELT, H. **110**, 232 [1920] (*Abh. 61*).
[5] Bio. Z. **21**, 131, 279 [1909].

wiegender Menge geliefert haben. Denn nach unserer Überzeugung handelt es sich um die Wirkungen mindestens zweier verschiedener Fermente, welche die Bildung verschiedener Reaktionsprodukte bewirken. Für die Unabhängigkeit beider Wirkungen scheint uns vor allem das Verhalten einer von der Zuckerraffinerie Frankenthal bezogenen Betriebshefe zu sprechen. Die aus ihr bereiteten Auszüge lassen nur ein p_H-Optimum, und zwar in der Nähe von p_H 5, erkennen. Die in spurenweise alkalischer Lösung am besten wirkende Enzymkomponente scheint dieser Hefe abzugehen (Abb. 2).

Die Ausbeuten an Disaccharid sind nicht nur von Hefe zu Hefe ungemein verschieden, sondern sie hängen auch von der Konzentration der angewandten Glucoselösungen in hohem Maße ab. In der Nähe von p_H 5 verläuft die Synthese in 40proz. Lösung am schnellsten.

[1853]

Beschreibung der Versuche.

I. Ausführung der Versuche.

Die Hefe-Auszüge wurden in der Regel aus gewaschener, abgepreßter Frisch-Hefe mit der 5fachen Menge Wasser, dem 5% Toluol zugesetzt wurden, unter sorgfältigem Neutralisieren mit 2proz. Ammoniak bereitet. Die Extraktionsdauer betrug jeweils 24 Stunden. Die Konzentrationsangaben bei den folgenden Versuchen bedeuten g Traubenzucker (KAHLBAUM, ger.) auf 100 ccm Hefe-Auszug + Phosphat-Gemisch. Die p_H-Werte wurden colorimetrisch geschätzt.

Beispiel für einen 40proz. Ansatz mit Grünwinkler Verbandshefe (Sinner A.-G.) bei p_H = 7,4: 40 g Glucose, 40 ccm Wasser, 40 ccm 20proz. Hefe-Auszug, 5 ccm $^m/_{15}$-prim.-Kaliumphosphat, 15 ccm $^m/_{15}$-sek.-Natriumphosphat, 10 ccm Toluol.

Zur Bestimmung der Reduktionsabnahmen bedienen wir uns des Hypojodit-Verfahrens von R. WILLSTÄTTER und G. SCHUDEL[1].

Dem Reaktionsgemisch werden Proben von 5 ccm entnommen und mit 5 ccm gesättigter Sublimat-Lösung (gelegentlich 10 ccm 10proz. Kaolin-Suspension) und 10 ccm Wasser versetzt. Man filtriert in 100-ccm-Meßkölbchen und benutzt 5 ccm bzw. die etwa 0,1 g Traubenzucker enthaltende Menge der Lösung zur Messung des Jodverbrauchs. Die Genauigkeit des Verfahrens beträgt, wenn man für 100proz. Überschuß des Oxydationsmittels sorgt und die zur Neutralisation der zugesetzten Phosphate nötige Alkalimenge beachtet, ± 0,05 ccm $^n/_{10}$-Jod, entsprechend ± 0,5% des gesamten Reduktionsvermögens.

Im angeführten Beispiel wurden unmittelbar nach Ansatz des Versuches 12,55 ccm, nach 10tägigem Stehen bei Zimmertemperatur 11,91 ccm $^n/_{10}$-Jod verbraucht. Daraus berechnet sich eine Abnahme der Aldehydgruppen um 5,1%, was einer Disaccharid-Synthese von 10,2% entspricht. Die Anwesenheit des Phosphats scheint auf die Reduktionsabnahmen ohne Einfluß zu sein. Bei übereinstimmender Wasserstoffzahl (p_H = 4,8 bis 5,0) erhält man mit verd. Essigsäure und mit prim. Kaliumphosphat in gleichen Zeiten nahezu gleiche Abnahmen des Reduktionsvermögens. Durch 4stündige Hydrolyse mit 0,5 n-Schwefelsäure im Dampfbade läßt sich der Anfangswert des Jodverbrauches wieder erreichen:

5 ccm eines 20fach verdünnten, 8 Tage alten Ansatzes mit Sinner-Hefe (40% Glucose) verbrauchten 8,68 ccm, nach der Hydrolyse 9,20 ccm $^n/_{10}$-Jod, während der Reduktionswert zu Beginn des Versuches 9,23 ccm derselben Jod-Lösung entsprach.

[1] B. 51, 780 [1918].

II. Einfluß der Acidität und der Zuckerkonzentration.

Sinner- und Löwenbräuhefe gaben bei 8- bzw. 7tägiger Versuchsdauer (20 bis 25°) die in Abb. 1 dargestellten Reduktionsabnahmen. $p_H = 2,5$ wurde mit einem Gemisch von prim. Phosphat und freier Phosphorsäure, p_H 3,9 mit verd. Essigsäure, p_H 4,5 mit prim., p_H 8,5 mit sek. Phosphat eingestellt. Die bei $p_H = 4$ bis 5 und bei $p_H = 7,3$ beobachteten Reduktionsabnahmen verhalten sich in beiden Fällen annähernd wie 7:5. Dieses Verhältnis gilt jedoch nicht allgemein. Ein Neutralautolysat einer 4 Jahre alten getrockneten Probe von Löwenbräu-Hefe lieferte uns bei 24stündiger Einwirkung auf 50proz. Glucose-Lösungen bei $p_H = 6,5$ 9,5% Synthese, $p_H = 6,8$ 0,0% Synthese, $p_H = 7,1$ 0,7% Synthese.

Zu dem mit einem Auszug aus Frankenthaler Hefe ausgeführten Versuch der Abb. 2 dienten die nämlichen Phosphat-Gemische; $p_H = 5$ bezieht sich auf verd. Essigsäure.

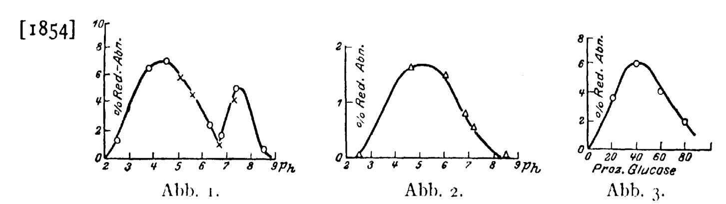
[1854] 

Abb. 1. Abb. 2. Abb. 3.

Nicht nur in bezug auf die Geschwindigkeit der Synthese, sondern auch in bezug auf das Ausmaß derselben bestehen zwischen den einzelnen Hefen bedeutende Unterschiede. Den von A. CROFT HILL angegebenen Endwert von 15% erreichten wir wiederholt schon nach 8tägiger Versuchsdauer (verschiedene Lieferungen von Sinner- und Löwenbräu-Hefe). Eine Münchener Bäckerhefe unbekannter Herkunft bewirkte sogar in 24 Stunden Reduktionsabnahmen, die 23,1 und 22,8% Disaccharid-Bildung entsprachen. Die aus den Angaben O. EMMERLINGS berechenbaren Synthesen von bis weit über 40% haben wir nicht erreicht.

Der Einfluß der Zucker-Konzentration, wie er in Abb. 3 dargestellt ist, bezieht sich nicht auf Gleichgewichtswerte. In 40proz. Lösung ist vor allem die Geschwindigkeit der Synthese am größten. Wie die nachstehende Tabelle zeigt, sind die Reduktionsabnahmen in 20- und 80proz. Lösung den Einwirkungsdauern noch annähernd proportional, während sie in 40proz. Lösung zwischen dem 3. und 6. Tage nur noch von 5,6 auf 6,4% ansteigen.

	Reduktionsabnahme	
Glucose	nach 3 Tagen	nach 6 Tagen
20%	1,9%	3,5%
40%	5,6%	6,4%
60%	1,8%	3,1%
80%	1,3%	2,7%

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 56, S. 2283 [1923].

74. ZUR KENNTNIS DES TRICHLOR- UND TRIBROM-ÄTHYLALKOHOLS*.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und WALTHER DUISBERG.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Eingegangen am 11. September 1923.)

Furfurol und Chloralhydrat sind die ersten Beispiele gewesen, an denen C. J. LINTNER, H. J. VON LIEBIG und H. LÜERS[1] die Methode der phytochemischen Reduktion entdeckt haben, die seitdem in den Händen von C. NEUBERG[2] und seinen Schülern zu großer und vielseitiger Bedeutung gelangt ist. Diese moderne, feine Methode der Reduktion von Carbonylverbindungen ist eigentlich die älteste Reduktionsmethode der organischen Chemie; ist sie doch das Verfahren für die Reduktion von Indigoblau in der Jahrtausende alten Gärküpe.

Bei Versuchen mit dieser Methode, um den noch wenig untersuchten Trichloralkohol anzuwenden und den noch unbekannten Tribrom-alkohol darzustellen, begegneten wir der Aufgabe, die Gärung, ohne welche die Hefe das Bromal nicht zu reduzieren vermag, im Gang zu halten bei Gegenwart eines so ausgesprochenen Hefegiftes, wie es der gebromte Aldehyd ist. Diese Schwierigkeit ist so behoben worden, daß wir den Tribromalkohol in bedeutender Ausbeute gewannen. Allerdings leidet diese infolge einer Nebenerscheinung; die Reduktion geht nämlich weiter, auch Dibrom-alkohol tritt in nennenswerter Menge auf, möglicherweise auch Monobromalkohol, den wir indessen nicht isoliert haben.

Reduktion von Bromal.

Die Bierhefe ist gegen die Bromverbindungen so empfindlich, daß es nötig ist und doch nicht genügt, Bromal in den Gäransatz sehr langsam einzuführen. Die

* *Der Tribrom-äthylalkohol ist in Erwartung starker narkotischer Wirkung aufgesucht worden. Herr Privatdoz. Dr. F. Eichholtz in Elberfeld (D. Med. Wochenschr. 53, 710 [1927] erkannte in ihm ein besonders für rectale Anwendung geeignetes Narkosemittel. Es ist unter den Bezeichnungen „E 107" und „Avertin" zur Anwendung gelangt.*

[1] C. J. LINTNER und H. J. V. LIEBIG, H. 72, 449 [1911]; C. J. LINTNER und H. LÜERS, H. 88, 122 [1913].

[2] C. NEUBERG und J. KERB, B. 46, 2225 [1913] und zahlreiche Abhandlungen aus den folgenden Jahren in der Biochem. Zeitschrift.

Reduktion gelang nur dann, wenn die Konzentration von Bromalhydrat mitsamt dem entstehenden gebromten Alkohol unter 0,2% gehalten war.

Die Lösung von 6 kg Zucker in 95 l Wasser brachten wir mit 2 kg abgepreßter untergäriger Hefe in lebhafte Gärung; sobald sie in Gang gekommen, ließen wir unter gelindem Rühren während 10 Stunden das Bromal gleichmäßig eintropfen, nämlich 120 g Bromalhydrat, gelöst in kohlensäurehaltigem Wasser (5 l), worin die Verbindung weniger leicht zersetzlich ist als in reinem Wasser. Am zweiten Tage, als die Gärung anfing, träger zu werden, wurde **[2284]** sie durch Zusatz von einem weiteren kg Zucker belebt. So gelang es, die Hefe 4 Tage in gutem Vergären zu halten. Nach einigen weiteren Tagen wurde unter Zusatz von Kieselgur die Hefe abgesaugt und der Filterrückstand mit Äther gut ausgewaschen, andererseits das Filtrat 3mal mit Äther ausgeschüttelt. Die mit Wasser zur Beseitigung von Bromalhydrat oftmals gewaschene Ätherlösung hinterließ beim Abdampfen, gegen Ende im Vakuum, einen Rückstand, den man am besten nur bis zum Übergehen der ersten sofort krystallisierten Anteile von Tribrom-äthylalkohol unter vermindertem Druck destillierte. Der beim Erkalten erstarrende Rückstand ergab beim Umkrystallisieren aus Petroläther eine Ausbeute von 33,6 g Tribromalkohol (29,5% vom angewandten Bromal).

Der Vorlauf der fraktionierten Destillation (bis gegen 90° unter 11 mm) enthielt Dibrom-äthylalkohol, dem in den ersten Anteilen Monobrom-äthylalkohol beigemischt zu sein schien, während er in den höher siedenden (von etwa 78° an) mit viel Tribrom-alkohol vermischt war. Die fraktionierte Destillation im Vakuum lieferte den Dibrom-alkohol genügend einheitlich zur Identifizierung, aber (gemäß den gefundenen Werten) nicht analysenrein.

0,1699 g Sbst. (1. Darst.): 0,0815 g CO_2, 0,0332 g H_2O. — 0,1650 g Sbst. (2. Darst.): 0,2997 g AgBr.

$C_2H_4OBr_2$. Ber. C 11,78, H 1,96, Br 78,41. Gef. C 13,09, H 2,18, Br 77,30.

Den Dibrom-äthylalkohol hat E. DEMOLE[3] als dicke, zuckersüß schmeckende Flüssigkeit vom Siedepunkt 179 bis 181° und $d_0 = 2,35$ beschrieben. Das vorliegende Präparat destillierte bei 70 bis 72° (unter 10 bis 11 mm), besitzt $d_0^1 = 2,33$ und ist in heißem Wasser mäßig, in kaltem schwer löslich.

Sein Urethan bildet Prismen vom Schmp. 90 bis 91°, die in Äther und in heißem Wasser leicht, in kaltem nur zu etwa 0,6% löslich sind.

0,1708 g Sbst.: 0,2628 g AgBr. — $C_3H_5O_2NBr_2$. Ber. Br 64,75. Gef. Br 65,48.

Tribrom-äthylalkohol, $CBr_3 \cdot CH_2 \cdot OH$.

Der Tribrom-alkohol krystallisiert in Prismen vom Schmp. 80° und siedet unter 10 bis 11 mm bei 92 bis 94°. Er ist in Alkohol und Äther sehr leicht, in Benzol leicht, in Petroläther warm leicht, kalt schwer löslich, in Wasser in der Kälte sehr schwer, in der Hitze mäßig löslich. Beim Erwärmen mit Natronlauge wird er unter Entbindung von Kohlenoxyd zersetzt.

[3] B. 9, 45 [1876], und zwar S. 50.

0,1753 g Sbst.: 0,0557 g CO_2, 0,0244 g H_2O. — 0,1782 g Sbst.: 0,0568 g CO_2, 0,0196 g H_2O. — 0,1419 g Sbst.: 0,2873 g ABr. — 0,1441 g Sbst.: 0,2880 g AgBr.

$C_2H_3OBr_3$. Ber. C 8,49, H 1,06, Br 84,79. Gef. C 8,67, 8,70, H 1,56, 1,23, Br 86,16, 85,05.

Das Tribrom-urethan, aus dem Alkohol mit Harnstoffchlorid gewonnen, bildet Prismen vom Schmp. 86 bis 87°, die in Alkohol und Äther sehr leicht, in kaltem Wasser mäßig löslich sind.

3,774 mg Sbst.: 0,156 ccm N (27°, 757 mm).

$C_3H_4O_2NBr_3$. Ber. N 4,30. Gef. N 4,68.

Zur Darstellung des Trichlor-äthylalkohols.

Da es uns gelang, bei der Reduktion des Chlorals nach dem Verfahren von C. J. Lintner und H. Lüers die Ausbeute auf 70% zu steigern, so beruht die Bildung des Trichlor-alkohols nicht auf Disproportionierung des angewandten Aldehyds, sondern auf Wasserstoff-Übertragung [2285] aus dem Zuckerzerfall, wie es C. Neuberg[4] schon aus den hohen Ausbeuten bei phytochemischen Reduktionen, aus der Bildung optisch-aktiver Alkohole und aus dem Gelingen der gleichartigen Reduktion von Ketonen gefolgert hat.

Der Gäransatz bestand aus 600 g Zucker in 5 l Wasser mit 100 g (abgepreßter) Bierhefe; dazu ließen wir die Lösung von 120 g Dinatriumphosphat und, als die Gärung lebhaft war, 40 g Chloralhydrat in $^1/_2$ l Wasser während $^3/_4$ Stunden eintropfen. Es dauerte 4 Tage, bis die Gärung bei gewöhnlicher Temperatur zum Stillstand kam, zu gleicher Zeit war das Chloral aus der Lösung vollständig verschwunden. Wir prüfen darauf[5], indem wir 10 ccm der Flüssigkeit mit 2 ccm verd. Natronlauge versetzen und durch eine rasche Wasserdampf-Destillation das aus vorhandenem Chloral gebildete Chloroform übertreiben. Das Destillat wird mit einigen Tropfen 3proz. Resorcin-lösung auf 50° erwärmt und mit 2 ccm Natronlauge versetzt (Probe von Schwarz[6]). Man sieht in einer Reihe solcher Proben im Verlaufe der Reduktion die Rotfärbung an Intensität abnehmen.

Nach der Gärung trennt man von der Hefe ab und isoliert aus der mit Kieselgur geklärten Lösung den Trichlor-alkohol, der in Wasser beträchtlich löslich ist, durch Aussalzen und erschöpfendes Ausäthern.

Die p-Nitrobenzoylverbindung entsteht bei Einwirkung des Säurechlorids auf die wäßrige Lösung von Trichlor-alkohol, wobei durch vorsichtige Zugabe von 10proz. Natronlauge unter Schütteln die Reaktion schwach alkalisch gehalten wird. Prismen, domatisch begrenzt, vom Schmp. 71°, sehr leicht löslich in Äther und Benzol, mäßig in Alkohol.

0,1468 g Sbst.: 0,2156 g AgCl. — 0,1614 g Sbst.: 0,2340 g AgCl. — 0,1704 g Sbst.: 7,8 ccm N (13,5°, 710,5 mm).

$C_9H_6O_4NCl_3$. Ber. N 4,69, Cl 35,68. Gef. N 4,84, Cl 36,33, 35,87.

p-Amino-benzoesäure-trichloräthylester. Die Reduktion der Nitroverbindung mit Schwefelwasserstoff und anderen Mitteln führt leicht zum Äthylester der Amino-benzoesäure. Die Chloratome werden geschont, wenn die Reduktion mit der berechneten Menge Ammonium-sulfid in alkoholischer Lösung langsam, nämlich bei 25 bis 27°, ausgeführt wird. Der Trichlor-ester, sehr leicht löslich in Äther und Alkohol, mäßig löslich in Petroläther, krystallisiert in feinen,

[4] C. Neuberg und F. F. Nord, B. 52, 2237 [1919], und zwar besonders S. 2241.

[5] Vgl. die Aufsuchung von Chloralhydrat in Leichenteilen nach H. Wefers Bettink und W. P. H. van den Driessen Mareeuw, C. 1906, I, 1906.

[6] Fr. 27, 668 [1888].

seidenglänzenden Nädelchen vom Schmp. 87°. Er zeigt keine bemerkenswerten physiologischen Eigenschaften, seine anästhesierende Wirkung ist sehr gering.

0,1799 g Sbst.: 8,7 ccm N (17°, 710 mm). — 0,1464 g Sbst.: 0,2333 g AgCl.

$C_9H_8O_2NCl_3$. Ber. N 5,22, Cl 39,65. Gef. N 5,30, Cl 39,42.

Carbamidsäure-trichloräthylester entsteht aus äquivalenten Mengen von Harnstoffchlorid[7] und Trichlor-alkohol in trockenem Äther und krystallisiert in Nadeln vom Schmp. 64 bis 65°.

0,1707 g Sbst.: 12,25 ccm N (23°, 720 mm). — 0,1662 g Sbst.: 0,3700 g AgCl.

$C_3H_4O_2NCl_3$. Ber. N 7,29, Cl 55,28. Gef. N 7,39, Cl 55,07.

[2286] Das Trichlor-urethan ist in etwa 100 Tln.* kalten Wassers löslich, leicht in heißem, in Alkohol, Äther und Chloroform sehr leicht, in Benzol leicht, in Petroläther sehr schwer löslich.

Nach der pharmakologischen und klinischen Prüfung[8], für die wir Herrn Geheimrat Prof. W. STRAUB und Herrn Prof. A. HAUPTMANN zu Dank verpflichtet sind, hat sich das Trichlor-urethan als ein gutes und harmloses Schlafmittel** erwiesen, bei dem die wirksamen und die toxischen Dosen weit auseinander liegen.

---

[7] Mit überschüssigem Harnstoffchlorid wird der Allophansäure-trichloräthylester gebildet, der in Prismen von rhombischem Habitus krystallisiert; Schmp. 182 bis 183°. Er ist in kaltem Wasser und in Äther schwer, in Alkohol leicht, in Essigester kalt schwer, warm leicht löslich.

3,700 mg Sbst.: 0,387 ccm N (25°, 747 mm). — 4,058 mg Sbst.: 7,37 mg AgCl.

$C_4H_5O_3N_2Cl_3$. Ber. N 11,89, Cl 45,22. Gef. N 11,75, Cl 44,92.

* *Im Original steht infolge Druckfehlers: „in etwa 10 Tln.“.*

[8] R. WILLSTÄTTER, W. STRAUB und A. HAUPTMANN, Münchn. med. Wochenschr. **69**, 1651 [1922]; C. **1923**. I, 1196.

** *Es ist unter dem Namen „Voluntal“ als Hypnoticum eingeführt worden.*

Abschnitt VIII.

ÜBER SPEZIFITÄT DER ENZYME, BESONDERS DER CARBOHYDRASEN; ÜBER EMULSIN.

Zeitschrift für physiologische Chemie **115**, S. 180 [1921].

75. ÜBER DIE SPEZIFISCHE NATUR VON SACCHARASE UND RAFFINASE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und RICHARD KUHN.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Mit 1 Abbildung.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. April 1921.)

Bei der Darstellung von Hefeauszügen und von Invertin sollte eine der ersten Aufgaben die Kennzeichnung der Lösungen und Präparate in enzymatischer Hinsicht sein, also die Untersuchung, welches Schicksal die zuckerspaltenden Enzyme der Hefe neben der Saccharase bei der Bildung von Lösungen, von Adsorbaten, von Elutionen haben und welche von diesen Enzymen in dem sog. Invertin noch enthalten sind. Diese bisher unbeantwortete Frage hängt mit einer zweiten ungelösten Frage eng zusammen. Es ist unbestimmt, welche enzymatischen Wirkungen dem Rohrzucker hydrolysierenden Enzym sonst noch zukommen und welche Fructosidspaltungen anderen spezifischen Hefeenzymen zuzuschreiben sind. Da Invertin namentlich für Raffinose starkes Spaltungsvermögen zeigt, nach E. BOURQUELOT und M. BRIDEL[1] mehr als für Gentianose, Stachyose u. a., so untersuchen wir fürs erste, ob Raffinose von Saccharase selbst oder von einem spezifischen Enzym hydrolysiert wird.

Es wird bisher zumeist angenommen, daß die Hydrolyse von Raffinose und Saccharose von demselben Enzym bewirkt [181] werde; E. FISCHER[1]), A. BAU[2]), E. BOURQUELOT[3]), H. E. ARMSTRONG[4]), C. S. HUDSON[5]) vertraten diese Auffassung. Sie

[1] Compt. rend. Bd. 152, S. 1060 [1911].

[1]) E. FISCHER und W. NIEBEL, Sitzungsber. d. preuß. Akad. 1896, S. 73; E. FISCHER, Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60 [1898].

[2]) Wochenschr. f. Brauerei Bd. 17, S. 698 [1900].

[3]) Journ. Pharm. et Chim. (6) Bd. 16, S. 578 [1902]; E. BOURQUELOT und M. BRIDEL, Compt. rend. Bd. 149, S. 361 [1909] und Bd. 152, S. 1080 [1911].

[4]) H. E. ARMSTRONG und W. H. GLOVER, Proc. Roy. Soc., B. Bd. 80, S. 312 [1908]; siehe auch E. F. ARMSTRONG, The simple Carbohydrates and the Glucosides, 3. Aufl., London 1919, S. 111.

[5]) Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 36, S. 1566 [1914]; C. S. HUDSON und T. S. HARDING, Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 37, S. 2193 [1915].

gründet sich darauf, daß die Saccharose ein Bestandteil des Raffinosemoleküls ist. Damit lassen sich aber Beobachtungen über tierisches Invertin nur unter der Voraussetzung in Einklang bringen, daß es verschiedene Invertine gibt. Nach W. Pautz und J. Vogel[6] und E. Fischer und W. Niebel[7] wird durch den Dünndarm des Hundes und des Pferdes die Raffinose nicht gespalten. „Das Rohrzucker spaltende Enzym des Dünndarms ist also" — nach E. Fischer und W. Niebel — „zweifellos mit dem Invertin der Hefe nicht identisch." Für diese Folgerung entfällt die Stütze, wenn sich die Hydrolyse von Rohrzucker und Raffinose auf verschiedene Enzyme zurückführen läßt.

Es genügt aber nicht, mit E. Fischer in verschiedenen Organismen verschiedene Invertine und verschiedene Maltasen anzunehmen, auch mit dem Vorkommen verschiedener Hefeinvertine und verschiedener Raffinasen in Hefen müßte man rechnen. P. Lindner[8] hat nämlich gefunden, daß Monilia candida Hansen und eine gewisse Hefe (Nr. 602 aus Danziger Jopenbier) Rohrzucker vergärt, Raffinose aber unversehrt läßt, daß andererseits Schizosaccharomyces octosporus Beijerinck und Hefe Nr. 37 (aus einem sizilianischen Traubenmost) Raffinose, aber nicht Rohrzucker vergärt. [182] Zu anderen Anschauungen kam H. Bierry[1]) in seinen Untersuchungen über die zuckerspaltenden Enzyme wirbelloser Tiere. Er nimmt neben dem Rohrzucker spaltenden Invertin ein auf alle d-Fructoside, also auf Stachyose, Gentianose, Raffinose und auch auf Rohrzucker wirkendes Enzym, die Lävulopolyase, an. Es soll sich nicht um ein besonderes Ferment, sondern „um eine Species derselben Gattung Invertin" handeln, „weil in allen Fällen, wo wir einen auf die genannten Polyosen aktiven Verdauungssaft angetroffen haben, derselbe auch Saccharose zu invertieren vermochte." Diese Anschauung wird indessen den Angaben P. Lindners über Schizosaccharomyces octosporus und Hefe Nr. 370 nicht gerecht und läßt auch die Mitteilung von L. Marino und G. Fiorentino[2]) unberücksichtigt, daß von den Enzymen des Malzes Raffinose ganz abgebaut (also über Melibiose hinweg), Rohrzucker aber nicht angegriffen wird.

Um die Wirkung des Invertins auf die beiden Zucker zu vergleichen, ermitteln wir Vergleichszeitwerte für Saccharase und Raffinase unter den Bedingungen der Maltasebestimmung von R. Willstätter und W. Steibelt[3]). Dieselbe Enzymmenge im nämlichen Volumen Lösung wirkt bei 30° auf äquivalente Mengen der Zucker ein, mit der Besonderheit, daß für jede einzelne Hydrolyse die optimale Wasserstoffzahl eingestellt wird. Für die Raffinosespaltung finden wir das Wirkungsoptimum wie für die Rohrzuckerhydrolyse bei $p_H = 4$ bis 5. Eine Anzahl von Invertinpräparaten, deren Reinheitsgrade z. B. durch die Zeitwerte 4,8 bis 0,86 nach C. O'Sullivan und

[6] Zeitschr. f. Biologie Bd. 32, S. 304 [1895].
[7] Sitzungsber. d. preuß. Akad. 1896, S. 73.
[8] Wochenschr. f. Brauerei Bd. 17, S. 713 [1900].
[1]) Compt. rend. Bd. 148, S. 949 [1909]; Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 415, 426, 446 [1912].
[2]) Gazz. chim. ital. Bd. 36, II, S. 395, und zwar S. 409 [1906].
[3]) Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 157, und zwar S. 169 [1920] (*Abh. 62*).

F. W. Tompson und nach H. v. Euler ausgedrückt werden, ergeben für den Quotienten

$$\frac{\text{Zeitwert für Raffinase}}{\text{Zeitwert für Saccharase}}$$

genau übereinstimmende Werte, nämlich 11,3. Daraus folgt, daß Saccharase und Raffinase, wenn es sich um zwei Enzyme [183] handelt, in den Löslichkeitsverhältnissen, in der Beständigkeit und im Verhalten gegen Adsorptionsmittel die größte Ähnlichkeit zeigen und keine Handhabe zu irgend einer Fraktionierung bieten. Es steht damit wesentlich anders bei den übrigen zuckerspaltenden Enzymen. Zum Beispiel verschwindet Maltase aus neutralen Hefeauszügen nach einiger Zeit durch Zersetzung, während Melibiase dem Invertin durch eine große Reihe von Operationen zu folgen vermag und manchmal noch in Invertinpräparaten von hoher Reinheit enthalten ist.

Das Verhältnis der beiden enzymatischen Hydrolysen ist schon früher von H. E. Armstrong und W. H. Glover[1] bestimmt worden. Ihre Arbeit, die eine andere Absicht verfolgt als die vorliegende Untersuchung, bringt nicht einen Vergleich der Wirkungsquotienten mit verschiedenem enzymatischen Material; sondern H. E. Armstrong und Glover ließen nur eine nicht näher bestimmte Invertinlösung, noch ohne Berücksichtigung der Wasserstoffionenkonzentration, auf die beiden Zucker einwirken, um aus dem Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten wie aus der verschieden raschen Spaltung der Zucker durch Mineralsäuren Schlußfolgerungen auf die sterischen Verhältnisse im Zuckermolekül zu ziehen, von denen seine Hydrolyse abhängt. Armstrong und Glover fanden mit käuflicher Raffinose das Verhältnis 1:3,8, mit gereinigter 1:5,4 für die Zeiten 50proz. Hydrolyse von Rohrzucker und Raffinose.

Mit den Zeitwertquotienten der Invertinpräparate vergleichen wir das Verhältnis der beiden enzymatischen Wirksamkeiten an Hefen selbst, und zwar an melibiasefreien, also obergärigen Hefen, da durch einen Gehalt an Melibiase die Bestimmung gestört würde. Zwei Brennereihefen, die in ihrem Enzymgehalt weit differieren, eine dänische und eine österreichische, gaben fast den gleichen Quotienten, nämlich 5,1 und 5,4, also Werte, die sich vom Wirkungsverhältnis der Präparate wesentlich unterscheiden. Daraus allein wäre schon zu schließen, daß trotz der Übereinstimmung von Präparat zu Präparat Saccharase und Raffinase verschiedene Enzyme sind.

[184] Dies ergibt sich noch deutlicher beim Vergleich verschiedener Hefen, also nach derselben Methode, mit der R. Willstätter und W. Steibelt in einer voranstehenden Arbeit die Nichtidentität von Maltase und α-Glucosidase nachgewiesen haben. Die reine Brennereihefe Rasse XII des Berliner Institutes für Gärungsgewerbe gab z. B. den Quotienten 12,3, in ihr ist also, auf dieselbe Menge Saccharase bezogen, fast 2,5mal weniger Raffinase enthalten als in den schon angeführten Oberhefen.

[1] Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 80, S. 312 [1908].

Die Spaltung des Rohrzuckers und der Raffinose ist also spezifischen Enzymen zuzuschreiben. Es wäre noch möglich, daß der Rohrzucker nicht durch Saccharase allein, sondern außerdem noch durch Raffinase hydrolysiert würde, also von einer Lävulopolyase im Sinne von Bierry, allein das Vorkommen von Hefen, die Raffinose, aber nicht Rohrzucker vergären, macht diese Anschauung sehr unwahrscheinlich.

Da unsere besten Invertinpräparate (z. B. das Präparat Nr. 2 der Tab. 4 vom Zeitwert 0,86) auch andere höhere Zucker, z. B. Stachyose spalten, so wird durch vergleichende Bestimmungen der Wirkungsquotienten, z. B. der Raffinase und Stachyase, zu entscheiden sein, ob die Hydrolyse der höheren Fructoside ein spezifisches Enzym für jeden einzelnen Fall erfordert.

Die Kennzeichnung einer Hefe in enzymatischer Hinsicht ist durch die Vergleichszeitwerte ihrer wichtigsten enzymatischen Fähigkeiten gegeben, z. B.:

Zeitwert für:	Maltase	α-Glucosidase	Saccharase	Raffinase
Dänische Oberhefe (21. II. 21)	162	252	0,52	2,65
Berl. Hefe XII (26. II. 21)	227	225	1,26	15,6
Berl. Hefe M (26. I. 21)	13400	∞	2,62	19,7

Das Verhältnis dieser Zeitwerte erlaubt natürlich keine Schlußfolgerung auf das Verhältnis der Mengen der entsprechenden Enzyme. Aber da die Enzyme, wie aus den bekannten Reaktionsgeschwindigkeiten hervorgeht, in weit höherem Maße [185] spezifische Reagentien für den Polyosenabbau sind als die Mineralsäuren, so werden keine so großen Unterschiede zwischen Menge und Wirkung auf verschiedene Zucker vorkommen wie bei den Säuren. Nach den Untersuchungen von E. F. Armstrong und R. J. Caldwell[1] über „The sucroclastic action of acids as contrasted with that of enzymes" wird die relative Leichtigkeit, mit der die Spaltung durch Säuren erfolgt, durch folgende Zahlen ausgedrückt:

1 für Lactose, 1,27 für Maltose, 0,17 für α-Methylglucosid, 1240 für Rohrzucker, 1040 für Raffinose.

Gleichen hydrolytischen Wirkungen auf die einzelnen Zucker werden nicht entfernt so verschiedene Konzentrationen der Enzyme wie der Mineralsäuren entsprechen.

Bestimmungsmethode.

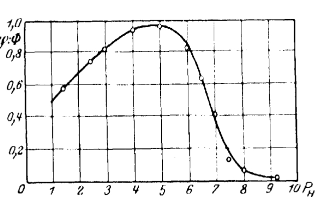
Die Spaltung der Raffinose in Melibiose und Fructose verfolgen wir polarimetrisch. Gemäß den für die Bestimmung von Invertin und Maltase aufgestellten Bedingungen wird als Zeitwert die Anzahl Minuten ermittelt, welche 0,5 g Trockengewicht von Hefe oder Enzympräparat brauchen würden, um bei 30° und optimalem p_H in 25 ccm 2,061 g $C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 5\,H_2O$ zu 50% zu spalten. Die vollständige Hydrolyse liefert 2,5proz. Fructoselösung. Die günstige Wasserstoffzahl (= 4,5) wird durch Zusatz von 1 ccm 20proz. NaH_2PO_4-Lösung eingestellt.

[1] Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 73, S. 526 [1904] und Bd. 74, S. 195 [1905].

Die Raffinose hatte uns teils Herr Prof. Dr. EDM. O. VON LIPPMANN in Halle a. S. und teils die Direktion der Zuckerraffinerie Hildesheim in freundlichster Weise zur Verfügung gestellt. Das Präparat gab in 8proz. Lösung übereinstimmend mit den Angaben der Literatur $[\alpha]_D^{20} = +104{,}4°$. Im 2-dm-Rohr beträgt die Anfangsdrehung der Bestimmungslösung (nach Verdünnen wie im Versuche mit $^1/_4$ Vol. 2n-Sodalösung[2]) 13,71°, nach der Spaltung in Melibiose + Fructose [186] 7,18°. Bei Verwendung von untergärigen Hefen und von Enzympräparaten aus ihnen kann die Melibiose der weiteren Hydrolyse durch die von E. FISCHER und P. LINDNER[1]) sowie von A. BAU[2]) entdeckte Melibiase anheimfallen; für die vollkommene Aufspaltung in Fructose, Glucose und Galaktose berechnet sich der Endwert der Drehung auf +1,70°.

Ein melibiasefreies Invertinpräparat vom Zeitwert 4 diente zur Bestimmung der geeigneten Wasserstoffionenkonzentration. Die folgende Tab. 1 zeigt, daß ein breites Gebiet von p_H 4 bis 5 optimal ist und daß der günstigste Punkt mit dem Optimum der Saccharasewirkung[3]) praktisch zusammenfällt.

L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN[4]) haben in ihrer exakten Untersuchung über „Die Wirkung der Wasserstoffionen auf das Invertin" angenommen, „daß bei jeder der optimalen Wasserstoffzahl nicht entsprechenden Acidität nur ein Bruchteil des vorhandenen Ferments in wirksamer Form zugegen ist".



Die Kurve, welche diesen Bruchteil ($\varphi : \Phi$) als Funktion von $-\log[H^\cdot]$ darstellt, wird neuerdings von L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN[5]) als Dissoziationsrestkurve einer Säure [187] betrachtet, die aus Invertin + 1 Mol. Saccharose besteht. Es wäre daher eine andere Abhängigkeit der Raffinosespaltung vom p_H sogar für den Fall zu erwarten, daß sie durch Saccharase selbst bewirkt wird, da ja die Dissoziationskonstanten der Verbindungen aus ein und demselben Enzym mit verschiedenen Substraten ungleich sein sollten. Die nebenstehende Abbildung zeigt, daß der logarithmische Parameter unserer Kurve etwa —6,8 beträgt, nahezu übereinstimmend mit den genauen Messungen von MICHAELIS, der für Saccharase —6,7 fand. Dagegen ist der langsame Abstieg der Kurve im stärker sauren Gebiet auffallend.

---

[2] Ebenso wurde die Bestimmungslösung für Saccharase zum Sistieren mit $^1/_4$ Vol. Soda versetzt; da in der voranstehenden Arbeit von WILLSTÄTTER und STEIBELT mit $^1/_5$ Vol. Soda verdünnt wurde, sind die Drehungsabnahmen in den beiden Arbeiten nicht übereinstimmend.

[1]) Wochenschr. f. Brauerei Bd. 12, S. 959 [1895]; dieses Enzym hat allerdings E. FISCHER als identisch mit Maltase betrachtet (Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60, und zwar S. 80 [1898]).

[2]) Wochenschr. f. Brauerei Bd. 12, S. 1062 [1895] und Bd. 20, S. 560 u. 575 [1903]; Chemikerzeitg. Bd. 19, S. 1873 [1895].

[3]) S. P. L. SÖRENSEN, Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131, und zwar S. 256 [1909]; L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN, Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 386 [1911].

[4]) Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 386 [1911].

[5]) Biochem. Zeitschr. Bd. 110, S. 217 [1920].

Tabelle 1.
Wirkungsoptimum der Raffinase. (30°; Puffer: Sörensensche Standardlösungen.)

Puffer (2,5 ccm auf 25)	p_H (angenähert)	nach 90 Minuten Drehungsabnahme °	nach 90 Minuten Spaltung %	nach 120 Minuten Drehungsabnahme °	nach 120 Minuten Spaltung %
2,2 ccm 0,1 mol. Na-citrat + 7,8 ccm 0,1 n-HCl .	1,5	3,09	47,5	3,69	56,6
3,5 ccm 0,1 mol. Na-citrat + 6,5 ccm 0,1 n-HCl .	2,5	3,64	55,8	4,17	64,0
4,0 ccm 0,1 mol. Na-citrat + 6,0 ccm 0,1 n-HCl .	3,0	3,84	58,9	4,46	68,4
5,6 ccm 0,1 mol. Na-citrat + 4,4 ccm 0,1 n-HCl .	4,0	4,13	63,3	4,71	72,2
10 ccm n/5 Na-acetat + 5 ccm n/5 Essigsäure . . .	5,0	4,18	64,1	4,83	74,0
1,2 ccm 1/15 mol. Na_2HPO_4 + 8,8 ccm 1/15 mol. KH_2PO_4	6,0	3,83	58,7	—	—
3 ccm 1/15 mol. Na_2HPO_4 + 7 ccm 1/15 mol. KH_2PO_4 .	6,5	3,29	50,5	3,91	60,0
6,2 ccm 1/15 mol. Na_2HPO_4 + 3,8 ccm 1/15 mol. KH_2PO_4	7,0	2,41	37,0	2,92	44,8
8,5 ccm 1/15 mol. Na_2HPO_4 + 1,5 ccm 1/15 mol. KH_2PO_4	7,5	0,94	14,4	1,26	19,4
9,4 ccm 1/15 mol. Na_2HPO_4 + 0,6 ccm 1/15 mol. KH_2PO_4	8,0	0,61	9,4	0,88	13,5
10 ccm 1 % NH_3 + 0,3145 g NH_4Cl	9,2	—	—	0,07	(1,0)

[188] Auch in den anderen Voraussetzungen der Bestimmung gleichen sich Raffinase und Saccharase. Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge trifft für die Spaltung der Raffinose in demselben Bereich von 1:40 zu wie nach H. v. Euler und O. Svanberg[1] für die Rohrzuckerinversion.

Versuch 1. Die Enzymlösung war ein Auszug aus dänischer Brennereihefe, die wir mit 2 Teilen Wasser unter Zusatz von Toluol 4½ Tage der Autolyse überließen. Das Filtrat wurde nach dem Klären mit Kaolin aufs Vierfache verdünnt. Es war frei von Melibiase, denn die Bestimmungslösung zeigte nach 18stündiger Wirkung bei 30° $\alpha = 7{,}32°$, nach 28 Stunden $\alpha = 7{,}22°$.

Versuch 2. Angewandt wurde die 0,1proz. Lösung eines Invertinpräparates (vom Zeitwert 4, Nr. 5 der Tab. 4) aus untergäriger Bierhefe (Löwenbräu München), das nach dem Adsorptionsverfahren von R. Willstätter und F. Racke gewonnen war. Das Präparat schien nichts mehr von der Melibiase der angewandten Hefe zu enthalten. Die Bestimmungslösung besaß nämlich bei $p_H = 4{,}5$ nach 24 Stunden $\alpha = 7{,}35°$ und nach 30 Stunden $\alpha = 7{,}23°$, in einer anderen Probe bei $p_H = 6{,}5$ nach 25 Stunden $\alpha = 7{,}23°$.

Tabelle 2. Enzymkonzentration und Umsatz.

Nr.	Enzymmenge (ccm in 25)	Zeit Min.	Drehungsabnahme °	Spaltung %	Zeit Min.	Drehungsabnahme °	Spaltung %
1	0,25	400	1,62	24,8	600	2,28	34,9
	0,5	200	1,67	25,6	300	2,33	35,7
	1,0	100	1,67	25,6	150	2,37	36,3
	2,5	40	1,71	26,2	60	2,41	36,9
	5,0	20	1,71	26,2	30	2,41	36,9
	10,0	10	1,70	26,0	15	2,38	36,5
2	2,5	60	3,21	49,2	90	3,89	59,6
	5,0	30	3,15	48,3	45	3,86	59,2
	7,5	20	3,11	47,7	30	3,90	59,8

[1] Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269, und zwar S. 275 [1919].

[189] Die Kinetik der Raffinasewirkung haben schon H. E. ARMSTRONG und W. H. GLOVER[1] untersucht und gefunden, daß die Spaltung der Raffinose durch eine Invertinlösung aus Oberhefe wie durch Säuren monomolekular verläuft. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch unter den Bedingungen unserer Bestimmung, wie sich aus der Tab. 3 ergibt. Von den beiden Versuchen, die wir mit den schon für die Tab. 2 verwendeten Enzymlösungen vornahmen, stimmt der mit Raffinaselösung aus Brennereihefe ausgeführte (Nr. 1) für streng monomolekularen Verlauf zwischen 30 und 60% Spaltung. Daher benützt man für Oberhefen und Lösungen daraus zur Umrechnung des jeweils beobachteten Spaltungsgrades auf 50% Hydrolyse die theoretische Kurve. Bei Versuch 2 mit Invertinpräparat fiel k. 10^5 zwischen 30 und 70% Spaltung von 381 auf 344, vielleicht infolge langsamer Zersetzung von Enzym, dessen Empfindlichkeit mit dem höheren Reinheitsgrad zugenommen hatte. Die aus Versuch 2 abgeleitete Kurve liegt den Bestimmungen der Präparate zugrunde.

Tabelle 3. Kinetik der Raffinasewirkung. (30°.)

Zeit	1. Versuch			2. Versuch		
Min.	Drehung °	Spaltung %	$\frac{10^5}{t}\log_{10}\frac{a}{a-x}$	Drehung °	Spaltung %	$\frac{10^5}{t}\log_{10}\frac{a}{a-x}$
0	13,71	0,0	—	13,71	0,0	—
10	13,26	6,9	310	13,13	8,9	404
20	12,76	14,5	340	12,50	18,5	445
30	12,30	21,6	352	12,12	24,4	404
45	11,67	31,3	362	11,58	32,6	381
60	11,14	39,4	362	11,07	40,5	376
80	10,55	48,4	359	10,50	49,2	367
110	9,80	60,0	362	9,83	59,4	356
150	—	—	—	9,17	69,5	344
160	9,00	72,1	346	—	—	—
200	—	—	—	8,65	77,5	324
220	8,35	82,1	340	—	—	—
260	—	—	—	8,10	85,9	327
∞	7,18	100,0	—	7,18	100,0	—

[190] Verhältnis zwischen Saccharase- und Raffinasewirkung von Invertinpräparaten.

Für die Prüfung des Verhältnisses zwischen Rohrzucker- und Raffinosespaltung standen einige Invertinpräparate zur Verfügung, die in Arbeiten von R. WILLSTÄTTER mit F. RACKE und mit J. GRASER auf verschiedenen Wegen gewonnen waren.

Das 1. Beispiel der Tab. 4 ist ein Präparat vom Zeitwert 4,8, das durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd gereinigt war; ein Jahr nach der Darstellung untersucht, erwies es sich als frei von Melibiase. Es ergab den Quotienten 11,2, genau denselben fanden wir in dem zweiten Beispiel der Tabelle, nämlich dem gleichen Präparat, das eine weitere Reinigung durch Adsorption mit Kaolin (vgl. R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, 1. Abh.[1]) Abschnitt C, III, 1. Beispiel) auf den Zeitwert 0,86 gebracht

[1] Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 80, S. 312, und zwar S. 317 [1908].

[1]) Ann. d. Chem. (im Druck) (*Abh. 45*).

hatte. Auch die anderen Invertinpräparate, soweit sie frei von Melibiase waren, führten zu genau dem gleichen Quotienten, so das 3. Beispiel der Tabelle, ein analog dargestelltes Invertin, dessen Zeitwert 0,7 bei einer weiteren Behandlung mit Uranacetat (WILLSTÄTTER und RACKE, I. Abh., Abschn. B, VIII) infolge teilweiser Zersetzung auf 1,96 zurückgegangen war, ferner zwei durch die beiden Adsorptionsverfahren gereinigte, und zwar von Frl. J. GRASER frisch dargestellte Präparate, eines von sehr geringem Melibiasegehalt und dem Zeitwert 1 (Nr. 4) und ein melibiasefreies vom Zeitwert 4 (Nr. 5). Das Beispiel 7 der Tabelle ist ein melibiasehaltiges Präparat vom ungünstigen Zeitwert 12,5, das nur durch Aluminiumhydroxyd gereinigt war.

Mit diesen Präparaten ähnlicher Darstellungen werden noch zwei auf ganz andere Weise gewonnene Invertinpräparate verglichen. Das Beispiel 8 der Tabelle, ein schwach melibiasehaltiges Invertin vom Zeitwert 2,3 (aus einer Lösung vom Zeitwert 0,98 durch Eindunsten erhalten), stammte aus einem bei neutraler Reaktion (WILLSTÄTTER und RACKE, Abschn. A, IX, 2) gewonnenen Hefeauszug und war nach einem später zu beschreibenden Verfahren durch Fällung mit Bleiacetat und [191] Adsorption mit Aluminiumhydroxyd gewonnen. Endlich das Beispiel 9 war von WILLSTÄTTER und RACKE (II. Abh., B, II) durch fraktionierten enzymatischen Abbau der Hefe dargestellt; es verdankte den Zeitwert 1,4 der Adsorption mit Tonerde, Kaolin und nochmals Tonerde. Es wies einen sehr deutlichen Gehalt an Melibiase auf, der den niedrigeren Quotienten 9,3 der Raffinase- und Saccharasewirkung erklärt.

Es ist bemerkenswert, wie konstant bei einer langen Reihe verschiedenartig ausgeführter Operationen, welche die Möglichkeit einer Fraktionierung bieten, das Verhältnis der beiden enzymatischen Wirkungen bleibt. Bei der Entfernung der Eiweißkörper aus wäßrig-acetoniger Lösung, die nicht ohne Verlust von Enzym stattzufinden pflegt, bei der Adsorption mit verschiedenen Mitteln, bei der Elution aus den Adsorbaten, beim Fällen mit organischen Lösungsmitteln, bei den öfters unter beträchtlichem Enzymverlust ausgeführten Vornahmen der Dialyse und des Eindampfens ist keine Anreicherung einer Enzymkomponente eingetreten. Die bei der Zerlegung der Tonerde- und Kaolinadsorbate angewandten Reagentien, wie Ammoniak, Natriumcarbonat, sekundäre Phosphate, wirken freilich unspezifisch als alkalische Mittel. Eher erschien als spezifisch die von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE (Abh. I, Abschn. B, VIII, 3) beschriebene Zerlegung des Invertinadsorbates an Aluminiumhydroxyd durch Rohrzucker. Wir prüften deshalb, ob sich dabei eine Verschiebung des Quotienten der beiden Zeitwerte erzielen läßt.

1. Versuch. Vom Präparat 5 der Tabelle wurden 38 mg aufgelöst und mit einer zur Adsorption nicht ausreichenden Menge Aluminiumhydroxyd aufgenommen. Das mittels der Zentrifuge abgetrennte und gewaschene Adsorbat brachten wir zur Bestimmung auf 50 ccm.

a) Saccharasewirkung. 2 ccm Adsorbat in 50 ccm Bestimmungslösung bewirkten in 26 Minuten 2,78° Drehungsabnahme. Daher Zeit der halben Hydrolyse 31,3 Minuten.

b) Raffinasewirkung. 10 ccm Suspension bewirkten in 50 ccm Raffinoselösung in 63½ Minuten 3,06° Drehungsabnahme. Daher halbe Hydrolyse nach 70 Minuten.

[192] Tabelle 4.

Quotienten der Raffinase- und Saccharasezeitwerte von Invertinpräparaten.
(30°; Enzymmengen für Rohrzucker- und für Raffinosespaltung im Verhältnis 1:5.)

Nr.	Präparat	Wirkung auf	Versuchszeit Min.	Drehungsabnahme °	Spaltung %	Zeit der halben Hydrolyse Min.	Quotient
1	Präp. nur durch $Al(OH)_3$ gerein., Zeitw. 4,8; frei von Melibiase	Rohrz.	60	3,55	54	54,5	11,2
		Raffin.	111	3,08	47	121,5	
2	Dass. Präp., weiter d. Kaolinads. gerein., Zeitw. 0,86, frei von Melibiase	Rohrz.	32	4,17	63,5	23,5	11,2
		,,	44,5	5,12	78	22	
		Raffin.	60	3,63	55,5	51	
		,,	71,5	4,01	61,5	50,5	
3	Ebenso gerein., dann mit Uranac. behandelt, Zeitw. 1,96	Rohrz.	28,5	2,33	35,5	43,5	11,4
		,,	50	3,64	55,5	44	
		Raffin.	58	2,22	34	101	
		,,	108	3,46	53	99	
4	Gerein. durch d. Ads.-Verf., Zeitw. 1, sehr schwach melibiasehaltig	Rohrz.	47,5	5,04	77	24	11,4
		Raffin.	70	3,81	58,5	54,5	
5	Gerein. nach den Ads.-Verf., Zeitw. 4, frei von Melibiase	Rohrz.	30	2,80	42,5	36	11,3
		,,	48,5	4,07	62	36,5	
		Raffin.	60	2,64	40,5	81	
		,,	110	3,88	59,5	82,5	
6	Gerein. nach den Ads.-Verf., Zeitw. 1,8	Rohrz.	32	2,29	35	50	10,3
		,,	52,5	3,50	53,5	48,5	
		Raffin.	52	2,04	31	102	
		,,	96	3,15	48,5	101,5	
7	Nur durch $Al(OH)_3$ gerein. Präp. vom Zeitwert 12,5, melibiasehaltig	Rohrz.	35	2,89	44	41	9,8
		,,	50	3,84	58,5	41	
		Raffin.	40	1,99	30,5	80	
		,,	65,5	2,79	43	81	
8	Gerein. mit Bleiac. u. durch $Al(OH)_3$, Zeitw. 2,3, wenig Melibiase enthaltend	Rohrz.	22	2,77	42	27	10,6
		Raffin.	65,5	3,56	54,5	57,5	
9	Präp. aus frakt. enzym. Hefeabbau, durch Ads.-Verf. gerein., Zeitw. 1,4, melibiasehaltig	Rohrz.	26,5	3,75	57	22,5	9,3
		Raffin.	59	3,98	61	42	

[193] Die übrige Adsorbatsuspension (38 ccm) spülten wir in einen 100-ccm-Kolben, versetzten sie mit 50 ccm 32proz. Rohrzuckerlösung und füllten zur Marke auf. Nach 30 Minuten zentrifugierte man die gebildete Elution ab und unterwarf nach zweimaligem Waschen mit Wasser den Rückstand, auf 35 ccm gebracht, wieder beiden Bestimmungen. Er wies von Saccharase noch 22, von Raffinase ebenfalls 22% auf.

a) Saccharasewirkung. 5 ccm Suspension in 50 ccm bewirkten in $151^1/_2$ Minuten 5,80° Drehungsabnahme. Zeit der halben Hydrolyse 52,2 Minuten.

b) Raffinasewirkung. 20 ccm Suspension in 50 ccm bewirkten in 166 Minuten 3,54° Drehungsabnahme. Halbe Hydrolyse 148 Minuten.

Der Quotient der Saccharase- und Raffinasezeitwerte war im Adsorbat 1:11,2, im rückständigen Aluminiumhydroxyd nach der Rohrzuckerelution 1:11,3.

2. Versuch. Aus Kopenhagener Brennereihefe wurde durch rasche Autolyse bei Gegenwart von Toluol in $4^1/_2$ Tagen eine Invertinlösung erhalten, die man zur Klärung mit 10% Kaolin behandelte. Das Filtrat ergab den Quotienten der Wirkungswerte

1:5,3. Aus der Lösung adsorbierten wir mit einer nicht ganz ausreichenden Menge Aluminiumhydroxyd das Enzym, um das Adsorbat wie beim 1. Versuch mit Rohrzucker zu eluieren.

Bestimmung des Adsorbates.

a) Saccharasewirkung. 2 ccm Adsorbatsuspension in 50 ccm Rohrzuckerlösung bewirkten in 22 Minuten 2,36° Drehungsabnahme, in 46 Minuten 4,20°. Zeit der halben Hydrolyse 33 und 33 Minuten.

b) Raffinasewirkung. 5 ccm Adsorbat in 50 ccm Raffinoselösung bewirkten in 38 Minuten 1,95° Drehungsabnahme, in 57 Minuten 2,74°. Halbe Hydrolyse 73,5 und 72,5 Minuten.

Nach dem Eluieren analysierten wir wieder die noch enzymhaltige Tonerde.

a) Saccharasewirkung. 5 ccm Suspension in 50 ccm bewirkten in 35 und $47^1/_2$ Minuten 2,77° und 3,60° Drehungsabnahme. Zeit der halben Hydrolyse 43 und 42 Minuten.

b) Raffinasewirkung. 20 ccm Suspension in 50 ccm bewirkten in 54 und 68 Minuten 3,31° und 3,86° Drehungsabnahme. Halbe Hydrolyse 53 und 53 Minuten.

[194] Im Adsorbat waren Saccharase und Raffinase anfangs mit dem Zeitwertquotienten 1:5,5 enthalten, nach dem Eluieren enthielt das Aluminiumhydroxyd noch $41^1/_2$% der Saccharase und $45^1/_2$% der Raffinase entsprechend dem Quotienten 1:5,0. Es ist also eine schwerlich über die Bestimmungsfehler hinausgehende kleine Verschiebung, kaum eine geringe Anreicherung (10%) der Raffinase erfolgt.

Auch bei der Bildung von Invertinlösungen durch Autolyse der Hefe gehen Saccharase und Raffinase ohne Änderung des Zeitwertquotienten in Lösung. Der Melibiasegehalt der untergärigen Hefe, von der unsere Invertinpräparate herstammen, hindert den Vergleich von Hefe und Präparaten hinsichtlich der Raffinosespaltung. Deshalb vergleichen wir in einer melibiasefreien Hefe, der dänischen Brennereihefe, und in der aus ihr gebildeten Autolysenflüssigkeit den Quotienten der beiden Enzymwirkungen.

Die Hefe wird im folgenden Abschnitt durch die Invertin- und Raffinasezeitwerte 0,52 und 2,65, also den Quotienten 5,1 gekennzeichnet. Die in 2 Tagen gebildete Autolysenflüssigkeit, mit Kaolin geklärt, ergab bei einer Enzymausbeute von etwa 3% für die Raffinase- und Invertinzeitwerte den Quotienten 5,5. Der in $4^1/_2$ Tagen gewonnene Hefeauszug enthielt nach dem Klären mit Kaolin 20% vom Enzym und entsprach dem Quotienten 5,3 der Raffinase- und Saccharasezeitwerte.

80 g Hefe mit 160 g Wasser unter Toluolzusatz autolysiert.

Auszug nach $2^1/_2$ Tagen.

a) Saccharasebestimmung. 2 ccm bewirkten in 50 ccm in 78 Minuten 3,45° Drehungsabnahme; Zeit der halben Hydrolyse 73,5 Minuten.

b) Raffinasebestimmung. 10 ccm bewirkten in 78 Minuten 3,21° Drehungsabnahme; Zeit der halben Hydrolyse 80,5 Minuten.

Auszug nach $4^1/_2$ Tagen.

a) Saccharasebestimmung. 0,25 ccm bewirkten in 50 ccm in 79 Minuten 3,08° Drehungsabnahme; Zeit der halben Hydrolyse 85,5 Minuten.

b) Raffinasebestimmung. 1,25 ccm bewirkten in 60 Minuten 2,41° Drehungsabnahme; Zeit der halben Hydrolyse 91 Minuten.

Die Werte, deren Fehler etwas größer sein können wie oben, differieren so wenig untereinander und vom Quotienten [195] der Hefe selbst, daß von einer Verschiebung des Verhältnisses nicht gesprochen werden kann.

Saccharase- und Raffinasewirkung einiger obergäriger Hefen.

An einigen Brennereihefen, die in der nachfolgenden Abhandlung von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT auf den Gehalt an Maltase und α-Glucosidase geprüft und in einer weiteren hinsichtlich des Gärvermögens untersucht werden, vergleichen wir die Wirkung auf Rohrzucker und Raffinose. Die Hefen weisen große Unterschiede auch im Gehalt an den hier in Betracht kommenden Enzymen auf. Die dänische Brennereihefe, die wir der Gefälligkeit des Herrn Prof. A. JÖRGENSEN verdanken, ist an Invertin 24-, an Raffinase 25mal reicher als die Stadlauer Spiritushefe. Im Quotienten der beiden Enzymwirkungen stimmen aber die enzymreichste und enzymärmste der untersuchten Hefen gut überein. Dagegen differieren sie und ihre Auszüge wie auch die Adsorbate daraus von den beschriebenen Invertinpräparaten derart, daß die Spaltung der beiden Zucker nicht auf ein und dasselbe Enzym zurückgeführt werden kann. Eine entscheidende Bestätigung für dieses Ergebnis wird beim Vergleich weiterer Heferassen (Tab. 5) gewonnen, der zu sicheren Ausschlägen im Quotienten

$$\frac{\text{Zeitwert für Raffinase}}{\text{Zeitwert für Saccharase}}$$

führt. Vor allem kommt die reine Brennereihefenrasse XII des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe in Betracht, die 2,4mal weniger Invertin und fast 6mal weniger Raffinase als die Kopenhagener Oberhefe enthält. Der Quotient der Zeitwerte wird hier fast $2^1/_2$mal ungünstiger für Raffinase als bei der dänischen Hefe. Bei der Rasse II des Berliner Instituts hingegen finden wir den Quotienten wieder gleich (5,1, mit Auszug aus Trockenhefe bestimmt) wie bei der Kopenhagener Hefe.

Tabelle 5.

[196] Quotienten der Raffinase- und Saccharasezeitwerte obergäriger Hefen.

Nr.	Hefe (Trockengewicht %)	Wirkung auf	g Frischhefe in 25 ccm	Versuchszeit Min.	Drehungsabnahme	Spaltung %	Vergleichszeitwert	Quotient
1	Brennereihefe Kopenhagen 21. II. 21 (21,6)	Rohrz.	0,05	20	2,82	43	0,52	5,1
		,,	0,25	35,5	4,38	66,5		
		Raffin.		41,5	4,51	69	2,65	
2	Spiritushefe Stadlau 25. II. 21 (30,3)	Rohrz.	0,125	60	1,48	22,5	12,1	5,4
		Raffin.	0,375	95	1,31	20	65	
3	Brennereihefe Rasse XII 26. II. 21 (25,0)	Rohrz.	0,125	30	4,25	65	1,26	12,3
		,,		43	5,28	80,5		
		Raffin.	0,375	52	2,31	35,5	15,6	
4	Brennereihefe M 26. I. 21 (22,2)	Rohrz.	0,125	31	2,30	35	2,62	7,5
		,,		43	3,08	47		6,5
		Raffin.	0,375	39,5	1,31	20	19,7	
		,,		60	2,21	34	16,9	
5	Branntweinhefe Sinner 3. III. 21 (28,0)	Rohrz.	0,125	34,5	2,50	38	3,36	7,8
		,,		49	3,36	51		7,0
		Raffin.	0,375	56	1,71	26	26,3	
		,,		83	2,63	40,5	23,5	

Eine Nebenerscheinung, die bei einigen Raffinasebestimmungen der Tabelle auffällt, ist das Sinken der Zeitwerte während der Bestimmungsdauer. Gleiches ist öfters bei Maltase und im voranstehenden auch bei α-Glucosidase beobachtet worden. Wie in jenen Fällen dürfte die Verbesserung der Raffinasezeitwerte als Enzymbildung im Laufe der Versuche zu deuten sein. Noch deutlicher zeigt sich diese Erscheinung im folgenden Versuch, in dem die Zeitwerte sehr genau bestimmt sind, da die beobachteten Spaltungen in den mittleren Teil der Reaktionskurve fallen.

[197] Hefe von Sinner. Nach $52^1/_2$, 85, 110 Minuten betrug die Spaltung 34, 50, 61 % entsprechend Zeiten halber Hydrolyse von 91, 85 und 78 Minuten. Das Sinken des Zeitwerts entspricht einem Zuwachs an Enzym von 15 %.

Die Zeitwertbestimmung wurde stets unter Toluolzusatz in kurzen Zeiten ausgeführt. Bei der Einwirkung der lebenden Hefe auf Raffinose im langdauernden Gärversuch sind die Bedingungen für die Raffinasebildung günstiger. Wir beobachteten unter diesen Umständen ein fast gleiches Ansteigen von Raffinase und Invertin. Hier ist daran zu erinnern, daß H. v. EULER [1] und seine Mitarbeiter im Laufe ausgedehnter Studien über Enzymbildung z. B. bei der Hefezüchtung in asparaginhaltiger Rohrzuckerlösung nicht sowohl einem spezifischen Invertinzuwachs als einer allgemeinen Erhöhung der vitalen Prozesse, einer allgemeinen Enzymbildung freilich mit sehr ungleicher prozentischer Zunahme der betreffenden Enzymwirkungen begegneten [2].

Für unseren Versuch diente die Brennereihefe von Sinner. Beim Vergären von Rohrzucker unter Zusatz von Pepton war bei ihr keine Enzymvermehrung eingetreten. Mit 5 g der Hefe (Nr. 5 der Tabelle) ließen wir 1 l 10proz. Raffinoselösung unter Zusatz von 1 g Pepton bei 25° 36 Stunden gären; ein Teil der Fructose blieb übrig. Die Hefe wurde mit der Zentrifuge abgetrennt und nach sorgfältigem Waschen zu einem Trockengehalt von 28,2 % abgepreßt. Für die Bestimmung brachten wir 2 g der Hefe unter Zusatz von etwas Toluol auf 50 ccm.

a) Saccharasebestimmung. 5 ccm bewirkten in 50 ccm Rohrzuckerlösung in 54 Minuten 3,91° Drehungsabnahme entsprechend 43,5 Minuten Zeit für halbe Hydrolyse.

b) Raffinasebestimmung. 15 ccm bewirkten in 50 ccm in 71 Minuten 2,53° und in 98 Minuten 3,39° Drehungsabnahme. Daher Zeit der halben Hydrolyse 101 und $92^1/_2$ Minuten.

[198] Der Zeitwert für Raffinase war von 26,3 bzw. 23,5 verbessert zu 17,1 und 15,6, der Vergleichszeitwert der Saccharase 2,45 anstatt 3,36. Der Quotient der Enzymwirksamkeiten betrug nach der Zunahme 7,0 und 6,4 statt der Anfangswerte 7,8 bis 7,0.

---

[1] Chemie der Enzyme, 2. Aufl., München und Wiesbaden 1920, 10. Kap., S. 284

[2] H. v. EULER und H. MEYER, Diese Zeitschr. Bd. 79, S. 274 [1912], und zwar S. 298.

Zeitschrift für physiologische Chemie 115, S. 199 [1921].

76. ÜBER DIE VERSCHIEDENHEIT VON MALTASE UND α-GLUCOSIDASE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und WERNER STEIBELT.

(Dritte Mitteilung[1] über Maltase.)

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Mit 1 Abbildung.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. April 1921.)

Nach EMIL FISCHER[2] wird α-Methylglucosid ebenso wie Maltose durch Hefe gespalten. Diese Wirkung schrieb FISCHER anfangs dem Invertin, dann der Hefemaltase zu, die er aus dem Pilze nach vorangehendem Trocknen auszulaugen vermochte. Das Glucosid ließ sich bei Gegenwart von Chloroform auch durch frische Hefe spalten, während es unter gleichen Bedingungen, also mit frischer Hefe bei Anwesenheit von Chloroform, nicht gelang, die Hydrolyse der Maltose herbeizuführen. Abgesehen von diesem Phänomen, das sehr kompliziert zu sein schien, „zeigen Maltose und α-Methylglucosid gegenüber den Enzymen der Hefe völlige Übereinstimmung". Es zeigte sich freilich bald[3], daß es andere maltosespaltende Stoffe gibt, die das α-Methylglucosid nicht verändern, daß nämlich das Serum von Pferde- oder Rinderblut auf das Glucosid gar nicht einwirkt, während es bekanntlich die Maltose leicht spaltet. Dieser Befund wäre mit der Vorstellung gut zu erklären, daß [200] Maltose und α-Methylglucosid auch von der Hefe mittels zweier verschiedener Enzyme hydrolysiert werden. E. FISCHER[1]) gab indessen der anderen Annahme den Vorzug, „daß ein und dasselbe Enzym der Hefe, die Maltase, sowohl die α-Methylglucoside als auch die Melibiose und verschiedene als Dextrine bezeichnete, kompliziertere Kohlehydrate angreifen kann. Die Erfahrung, daß einzelne Hefen nur die Maltose, aber nicht die Melibiose spalten, oder daß es Maltasen gibt, wie z. B. im Blut der Säugetiere, welche die α-Glucoside unberührt lassen, ist kein triftiger Grund dagegen". Während aber

[1] Die ersten Mitteilungen: Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 232 [1920] und Bd. 111, S. 157 [1920].

[2] Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 26, S. 2400 [1893]; Bd. 27, S. 2478 u. 2985 u. 3479 [1894]; Bd. 28, S. 1429 [1895].

[3] E. FISCHER und W. NIEBEL, Sitzungsber. d. Preuß. Akad. d. Wiss. 1896, S. 73; E. FISCHER, Unters. über Kohlehydrate und Fermente, Berlin 1909, S. 868.

[1]) Diese Zeitschr. Bd. 26, S. 60 [1898], und zwar S. 80.

nach der Ansicht von E. FISCHER[2] die Entscheidung dieser Frage noch unsicher bleibt, „solange man nicht imstande ist, die Enzyme als einheitliche chemische Individuen zu charakterisieren", wird seitdem in der Literatur die Identität oft mit Bestimmtheit angenommen[3]. Dennoch ist diese Annahme nicht zutreffend und sie läßt sich widerlegen, ohne daß man es unternimmt, eines der beiden Enzyme „im reinen Zustand zu isolieren".

Das Verhalten der Hefe bei Gegenwart von Chloroform gegen Maltose beruht wahrscheinlich darauf[4], daß beim Abtöten der Hefe durch Chloroform die Produktion von Säure in der Hefezelle einsetzt und in ihr ein für die Wirkung der Maltase ungünstiges Milieu schafft. Das Ausbleiben der Maltosehydrolyse unter den Versuchsbedingungen von E. FISCHER ist weniger auf Zerstörung der Maltase durch die von der Hefe gebildete Säure, als auf zu hohen Säuregrad am Reaktionsort zurückzuführen. Wenn unter gleichen Bedingungen die Spaltung von α-Methylglucosid erfolgt, so ist wohl anzunehmen, daß diese Hydrolyse toleranter gegen Veränderung der Reaktionsbedingungen ist und von einem anderen Enzym bewirkt wird.

Daß Maltase und Glucosidase wirklich zwei verschiedene [201] Enzyme sind, folgt daraus, daß die enzymatische Wirkung der Hefe auf die Substrate, ausgedrückt durch die Zeitwerte der Hefe für Maltase und α-Glucosidase, kein konstantes Verhältnis aufweist. Den Quotienten

$$\frac{\text{Zeitwert für } \alpha\text{-Glucosidase}}{\text{Zeitwert für Maltase}}$$

finden wir beispielsweise bei verschiedenen Brauereihefen zwischen 7,7 und 0,9 schwankend, noch tiefer fällt er bei Brennereihefe. Auch bei einer einzigen Hefeprobe ist dieses Verhältnis leicht veränderlich. Beim Ruhen der Hefe bei niedriger Temperatur wächst bald der Gehalt an Maltase, bald an Glucosidase, so daß bei 1- bis 3 tägigem Lagern der Quotient z. B. von 5,9 in 3,3 oder von 3,0 in 5,9 übergeht. Endlich verschiebt sich das Verhältnis der beiden Zeitwerte bei der Darstellung von Hefeauszügen durch Autolyse. Hefe, die den Zeitwertquotienten 5,9 aufwies, lieferte eine Enzymlösung mit dem Verhältnis 2,9 der beiden enzymatischen Wirksamkeiten.

Aus der Verschiedenheit der Maltose und α-Glucosid spaltenden Enzyme ist zu folgern, daß die Hefe für die Hydrolyse zusammengesetzter Zucker eine größere Zahl besonderer Enzyme ausbildet als man bisher annahm.

Quantitative Bestimmung der α-Glucosidase.

Die Wirkung der Hefe und der Hefeauszüge auf Methylglucosid soll gleich derjenigen auf Maltose[1]) durch die Zeit in Minuten bestimmt werden, die 1 g trockene

[2] Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 1429 [1895], und zwar S. 1438.

[3] Vgl. z. B. E. F. ARMSTRONG, The simple carbohydrates and the glucosides, 3. Aufl., London 1919, S. 103 (auch S. 11 u. 120): „In view of the behaviour of maltose towards maltase, it is considered to be a glukose-α-glucoside, since it is only α-glucosides which are hydrolysed by maltase."

[4] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 157 [1920].

[1]) Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 233, und Bd. 111 S. 168.

Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung braucht, um bei 30° 1,347 g α-Methylglucosid (entsprechend 1,25 g abzuspaltender Glucose) zur Hälfte zu hydrolysieren, wenn diese in 50 ccm zusammen mit 60 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ und 45 mg KH_2PO_4 enthalten sind (d. i. bei $p_H = 6{,}8$).

Die Hydrolyse des Glucosids verfolgen wir polarimetrisch, was mit der gleichen Genauigkeit wie nach der Reduktionsmethode ausführbar ist. Die Glucosidlösung besitzt nach dem Verdünnen mit 20% 2 n-Sodalösung, wie es im Versuch zur Sistierung der Spaltung und zur Beendigung der Multirotation [202] geschieht, entsprechend $[\alpha]_D = +158°$ den Anfangswinkel $+7{,}10°$, nach vollkommener Spaltung $+2{,}20°$.

Das Optimum der Wirkung von Hefeauszügen auf α-Methylglucosid liegt nach P. Rona und L. Michaelis[1] bei $p_H = 5{,}8$ bis 6,6, und zwar schien 6,2 den allergünstigsten Punkt darzustellen. Da Michaelis und Rona[2] für die Maltosespaltung den Bereich von p_H 6,1 bis 6,8 optimal gefunden hatten, mit 6,6 als allergünstigstem Punkt, so schien diese Differenz zwar für eine Verschiedenheit beider Fermente zu sprechen, doch waren die Unterschiede in der Wirksamkeit innerhalb des ganzen angegebenen Gebietes nicht groß genug, um sichere Schlüsse zu gestatten.

Wir ließen beim Glucosid die Spaltung wie bei Maltose mit spurenweise saurer Reaktion von $p_H = 6{,}8$ verlaufen, da wir weder für Maltase- noch Glucosidasewirkung zwischen 6,0 und 6,8 über die Fehlergrenze hinausgehende Unterschiede beobachten konnten (Tab. 1). Auf beginnend alkalischem Gebiet erwies sich die Wirkung abgeschwächt, aber weniger als in den Versuchen von Michaelis und Rona. Die Wasserstoffzahl wurde durch verschiedene Mischungsverhältnisse des Phosphatpuffers nach S. P. L. Sörensen[3] variiert.

Tabelle 1. Spaltung von Maltose und α-Methylglucosid bei p_H 6,0 bis 7,8.

<table>
<tr><th rowspan="2">p_H</th><th colspan="2">Maltase</th><th colspan="2">α-Glucosidase</th></tr>
<tr><th>Maltosespaltung</th><th>Zeitwert des Hefeauszugs</th><th>Glucosidspaltung</th><th>Zeitwert des Hefeauszugs</th></tr>
<tr><td>6,0</td><td>43,0</td><td>86</td><td>32,7</td><td>142</td></tr>
<tr><td>6,4</td><td>42,8</td><td>87</td><td>33,3</td><td>137</td></tr>
<tr><td>6,8</td><td rowspan="2">42,7</td><td rowspan="2">87</td><td>32,7</td><td>142</td></tr>
<tr><td>6,8</td><td>28,2</td><td>280</td></tr>
<tr><td>7,2</td><td>41,4</td><td>93</td><td>24,5</td><td>340</td></tr>
<tr><td>7,8</td><td>40,3</td><td>99</td><td>24,5</td><td>340</td></tr>
</table>

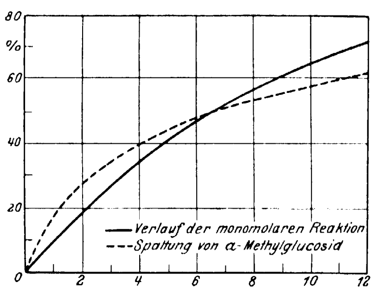
[203] Die Bestimmung der Glucosidasewirkung setzt voraus, daß die Beziehung zwischen Reaktionsdauer und Umsatz bekannt ist, und daß für einen gewissen Umsatz das Produkt aus Enzymmenge und Zeitdauer konstant gefunden wird. Im Bereiche von 1:10 trifft es genau zu, daß die Zeiten gleichen Umsatzes sich umgekehrt wie die Fermentmengen verhalten.

[1] Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 148 [1913] und L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914, S. 71.

[2] Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 70 [1913].

[3] Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 131 [1909] und Bd. 22, S. 352 [1909].

1 ccm Enzym in 50 ccm bewirkten in 800 Minuten 1,57° Drehungsabn. entspr. 32,0% Spaltung,
2 ,, ,, ,, 50 ,, ,, ,, 400 ,, 1,57° ,, ,, 32,0% ,,
5 ,, ,, ,, 50 ,, ,, ,, 160 ,, 1,54° ,, ,, 31,4% ,,
10 ,, ,, ,, 50 ,, ,, ,, 80 ,, 1,54° ,, ,, 31,4% ,,



Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der α-Glucosidasewirkung begegnen wir sehr ähnlichen Verhältnissen wie bei der Maltosespaltung. Abweichend von der Inversion des Rohrzuckers fällt im Verlauf der Hydrolyse des Glucosids k aus $1/t \cdot l_n a/a - x$ stark ab. Um aus der jeweils beobachteten Glucosidspaltung die der 50proz. Spaltung entsprechende Zeit zu ermitteln, dient uns die aus dem Beispiel der Tab. 2 und zwei weiteren Versuchen abgeleitete Reaktionskurve[1].

[204]

Tabelle 2.

Zeitlicher Verlauf der α-Glucosidasewirkung. (30°; 2,694proz. Glucosidlösung.)

Zeit Min.	Drehungsabn. °	Umsatz %
10	0,37	7,6
20	0,60	12,3
40	1,00	20,4
60	1,31	26,7
100	1,76	35,9
160	2,25	45,9
240	2,60	53,1
340	2,95	60,2

Auf dieser Grundlage geschieht die Bestimmung der Glucosidase auch in den Hefen nach dem Verfahren der Maltasebestimmung, das auf rascher Verflüssigung der Hefe durch Essigester, Neutralisation der entstehenden Säure mit Ammoniak und Einstellung der für die Enzymreaktion günstigen Wasserstoffzahl beruht. Bei vielen Hefen von normalem Enzymgehalt entspricht der Verlauf der Glucosidspaltung der ermittelten Reaktionskurve.

Hefe der Löwenbrauerei München, 1. XII. 1920.

Nach 83 Minuten Drehungsabn. 1,29°, Spaltung 26,3%, Zeitwert 145.
,, 130 ,, ,, 1,65°, ,, 33,7%, ,, 145.

Bei Hefen, die auf α-Methylglucosid schwach wirken, wird wie bei maltasearmen mitunter eine Abweichung in dem Sinne gefunden, daß sich der Zeitwert bei längerer Versuchsdauer günstiger als bei kurzer ergibt.

[1] Für jeden der drei Versuche wurde durch Interpolation aus den nächsten vor und nach 50% gelegenen Beobachtungspunkten die Zeit (200, 340, 326 Minuten) für 50% Spaltung ermittelt und gleich 6,52 gesetzt, dem Zeitwert der theoretischen Kurve bei 50%. Daraus ergibt sich das Verhältnis, in dem die Beobachtungszeiten der einzelnen Versuche umzurechnen sind.

Hefe der Spatenbrauerei München, 6. XII. 1920.

Nach 120 Minuten Drehungsabn. 1,52°, Spaltung 31,0%, Zeitwert 165.
" 180 " " 2,05°, " 41,8%, " 140.

Kopenhagener Brennereihefe, 24. II. 1921.

Nach 154 Minuten Drehungsabn. 1,30°, Spaltung 26,5%, Zeitwert 250.
" 408 " " 2,54°, " 51,8%, " 175.

Diese Erscheinung führen wir auf Enzymzuwachs zurück, auf postmortale Neubildung des Enzyms im Laufe der langen [205] Bestimmungsdauer[1]. In solchen Fällen werden für eine Hefe zwei Zeitwerte verzeichnet: ein durch Extrapolieren für den Zeitpunkt des Bestimmungsanfanges abgeleiteter und ein für das Ende der Bestimmungsdauer gefundener. Für die beiden erwähnten Hefen sind diese Zeitwertpaare:

Hefe der Spatenbrauerei: 210 und 140 für Glucosidspaltung, 230 und 125 für Maltosespaltung,
Kopenhagener Hefe: 300 und 175 für Glucosidspaltung, 165 und 155 für Maltosespaltung.

Verhältnis zwischen Maltose- und Glucosidspaltung.

Für den Vergleich der Wirkungen auf Maltose und Methylglucosid haben wir eine Anzahl von Brauereihefen in ganz frischem Zustand untersucht und von Brennereihefen, die nach dem Eintreffen der Postsendungen oder kurzem Aufbewahren im Eisraum zur Bestimmung dienten. Die Brennereihefen sind in der nachstehenden Abhandlung* über maltasearme Hefen genauer besprochen. Die Brauereihefen entstammten den Betrieben, nur die Frohberg-Unterhefe ist eine Reinkultur, für deren Überlassung wir Herrn Privatdoz. Dr. Lüers, Direktor der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München, zu bestem Dank verpflichtet sind. Auch die Weinhefe, Assmannshäuser, verdanken wir der Freundlichkeit des Herrn Direktor Dr. Lüers.

Hefeproben von 11 g wurden verflüssigt, neutralisiert und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. Von den Suspensionen verwendeten wir je 10 oder 20 ccm einerseits zur Maltase-, andererseits zur Glucosidspaltung. Die Zeiträume für die beiden Reaktionen waren gewöhnlich verschieden, da die Maltosespaltung rascher verlief.

Von Quotienten der Maltase- und Glucosidase-Zeitwerte werden in allen Fällen die Anfangswerte und in den Fällen, wo die Maltase- und Glucosidasebestimmungen nach gleicher Gesamtdauer vorliegen, auch die Endwerte angeführt. Die [206] meisten Unterhefen zeigen in ihrem Spaltungsvermögen für Methylglucosid nahe Übereinstimmung. Viel größer sind die Schwankungen im Gehalt an Maltase, woran die Unterhefen verhältnismäßig reich sind. Die Quotienten der beiden Enzymwirkungen liegen bei den Brauereihefen, wie die Tab. 3 zeigt, zwischen 7,7 und 0,9. Die untersuchten Oberhefen sind an beiden Enzymen sehr arm, ohne daß wie bei den Brauereihefen eines derselben wesentlich überwiegt; der Quotient fällt bis 0,7.

[1] Diese Erscheinung wird von Willstätter und Racke in einer Abhandlung über Invertin, die in den Ann. d. Chem. erscheinen wird, genauer behandelt (*siehe auch S. 789*).

* *Abschn. VII, Abh. 63.*

Tabelle 3. Maltase- und Glucosidasewirkung verschiedener Hefen.

Hefe (Trockengewicht in %)	Maltase Versuchszeit	Maltase Drehungsabn.	Maltase Zeitwert	Glucosidase Versuchszeit	Glucosidase Drehungsabn.	Glucosidase Zeitwert	Quotient der Zeitwerte
Löwenbräu 1. XII. 20 (22,7)	32	2,35	32,5	83	1,29	145	4,5
	65	3,20	32,5	130	1,65	145	
Hofbräu 3. XII. 20 (24,2)	40	2,16	52	100	1,32	175	3,4
	96	3,20	51	150	1,88	175	
Spatenbräu 6. XII. 20 (23,7)	60	1,40	195	120	1,52	165	Anfangsw. 0,9
	180	2,86	125	180	2,05	140	Endwert 1,1
Pschorrbräu 7. XII. 20 (25,2)	60	3,40	29	120	1,50	175	Anfangsw. 7,7
				180	2,00	155	
Frohberg Unterh. Reink. 4. II. 21 (23,6)	90	2,92	58	90	0,82	280	Anfangsw. 5,5
				140	1,22	260	
Weißbräu Tal (13. XII. 20 (24,0)	40	1,95	65	80	1,20	165	2,5
	80	2,65	66	190	1,95	165	
Weinhefe Assmannsh. 4. II. 21 (27,0)	90	1,43	320	90	0,40	1000	Anfangsw. 2,5
[207]	160	2,09	250	160	0,70	800	Endwert 3,2
Brennereihefe M 23. XII. 20 (24,3)	160	0,25	3500	160	0,24	2400	0,7
Brennereihefe M 12. I. 21 (24,5)	450	1,00	2600	450	0,75	1800	0,7
Brennereihefe Rasse II 12. II. 21 (34,2)	150	1,34	740	280	1,25	760	1,0
Brennereihefe Rasse XII 26. II. 21 (25,0)	100	1,71	230	100	1,13	230	Anfangsw. 0,8
	150	2,48	150	150	1,62	195	Endwert 1,3
Brennereihefe Kopenhagen 21. II. 21 (21,6)	77	1,65	160	154	1,30	250	Anfangsw. 1,8
	204	2,62	155	408	2,54	175	Endwert 1,1

Da sogar nach dem Abtöten der Hefe eine Neubildung der kohlehydratspaltenden Enzyme angenommen werden muß, ist es nicht überraschend, daß in der ruhenden Frischhefe Enzymbildung erfolgt. Abnahme von Maltase oder α-Glucosidase wurde nie beobachtet. Aber große Verschiebung in dem Verhältnis der Maltase- und Glucosidasezeitwerte trat bei manchen Brauereihefen während ein- oder mehrtägigem Aufbewahren im Kühlraum ein. Dabei war keine Regelmäßigkeit zu erkennen. Einmal erfolgte großer Zuwachs an Maltase, sogar Verdoppelung des Maltasegehalts

[208] Tabelle 4. Verschiebung der Zeitwertquotienten beim Lagern der Hefen.

Hefe (Trockengewicht in %)	Maltase Versuchszeit	Maltase Drehungsabn.	Maltase Zeitwert	Glucosidase Versuchszeit	Glucosidase Drehungsabn.	Glucosidase Zeitwert	Quotient der Zeitwerte
Löwenbräu 14. XII. 20 (22,7) frisch	40	2,80	28	120	1,53	155	Anfangsw. 5,9
	80	3,72	28	210	2,10	150	
nach 3 Tagen	60	3,40	26	120	2,10	86	3,3
Spatenbräu 15. XII. 20 (23,3) frisch	40	2,34	42	120	1,80	115	Anfangsw. 2,9
	80	3,17	40	210	2,44	105	
nach 3 Tagen	60	2,92	37	90	1,95	73	2,0
Spatenbräu 17. XII. 20 (23,2) frisch	40	2,08	52	80	1,20	150	Anfangsw. 3,0
	80	2,90	50	180	2,00	140	
nach 3 Tagen	50	3,12	26	100	1,37	155	5,9
				130	1,60	155	

in 24 Stunden, während die Glucosidase konstant blieb[1]. In anderen Fällen blieb der Maltasegehalt ungefähr konstant und die Wirkung auf Methylglucosid erfuhr bedeutende Verstärkung. Diese Beobachtungen (Tab. 4) stimmen wie der Vergleich der verschiedenen Hefen nicht zu einem engen Zusammenhang von Maltase und α-Methylglucosidase.

Veränderung des Quotienten der Enzyme beim Auflösen.

Die Auflösung der kohlehydratspaltenden Enzyme aus der Hefe ist kein einfacher Lösungsvorgang. Dieselben werden, wie in zwei Abhandlungen über Invertin, die sich im Druck befinden, von R. Willstätter und F. Racke gezeigt wird, erst durch einen enzymatischen Abbauvorgang freigelegt und in Lösung übergeführt. Die Verschiedenheit der Maltase und der α-Glucosidase zeigt sich nun auch darin, daß die beiden [209] Enzyme beim Ausziehen der Hefe nicht in gleichem Maße in Lösung gehen, also nicht mit demselben Quotienten der Zeitwerte in den Hefeextrakten wirken, wie in den Hefen selbst (Tab. 5). Die Verschiebung kann, was für unsere Schlußfolgerung belanglos ist, auch auf ungleicher Beständigkeit der Enzyme in der Lösung beruhen.

Zwei Brauereihefen lieferten Enzymlösungen unter verhältnismäßiger Anreicherung der α-Glucosidase. Bei einer Brennereihefe trat eine Verschiebung im entgegengesetzten Sinne ein, aber da in diesem Falle die Hefe im getrockneten Zustand verarbeitet wurde, kann schon beim Liegen und Entwässern durch Zunahme der Maltase, die wirklich zu beobachten war, die Verschiebung vorbereitet worden sein.

Tabelle 5. Verschiebung der Zeitwertquotienten beim Extrahieren der Hefen.

Hefe (Trockengewicht in %)	Maltase			Glucosidase			Quotient der Zeitwerte
	Versuchszeit	Drehungsabn.	Zeitwert	Versuchszeit	Drehungsabn.	Zeitwert	
Löwenbräu 14. XII. 20 (22,7) Hefe	80	3,72	28	210	2,10	150	Anfangsw. 5,9
Extrakt	30	2,80	41	80	1,75	160	3,9
Spatenbräu 17. XII. 20 (23,2) Hefe	50	3,12	26	130	1,60	155	Anfangsw. 5,9
Extrakt	60	2,73	87	100	1,54	255	2,9
Rasse XII 26. II. 21 (25,0) Hefe	100	1,71	230	100	1,13	225	Anfangsw. 0,8
	150	2,48	150	150	1,62	195	Endwert 1,3
Extrakt aus Trockenhefe	100	2,08	265	100	1,20	390	
	156	2,58	260	150	1,55	390	1,5

Die Enzymlösungen gewannen wir durch rasche Autolyse bei neutraler Reaktion.

200 g Hefe werden in einer Pulverflasche mit 10 ccm [210] Chloroform verrieben. Die Verflüssigung und die Produktion von Säure trat rasch ein und war in einer Viertelstunde ziemlich beendet. Darauf verdünnten wir mit 200 ccm Wasser und neutrali-

[1] Auch in einem zweiten Fall wurde eine solche Zunahme der Maltase festgestellt, während hier die Bestimmung der Glucosidase für die aufbewahrte Hefe fehlt.

Spatenbräuhefe 6. XII. 20: In 60 Minuten Drehungsabn. der Maltoselösung 1,40°, Maltasezeitwert 195. Dieselbe Hefe, 3 Tage aufbewahrt: In 60 Minuten Drehungsabn. der Maltoselösung 2,35°, Maltasezeitwert 64.

sierten mit 1 proz. Ammoniak, wovon beispielsweise 40 bis 70 ccm erforderlich waren. Zur Autolyse wurde die Wassermenge noch etwas vermehrt, so daß auf 1 Teil Hefe $1^1/_2$ Teile Wasser trafen; die weitere Säurebildung war nicht mehr erheblich. Nach 24 bis 48 Stunden filtrierten wir den Auszug ab. Die Ausbeute an Maltase und α-Glucosidase in diesen Hefeauszügen war zwar sehr gut, mitunter über die Mengen in der Hefe weit hinausgehend, aber leider sind die Enzyme darin wenig haltbar, weniger als in den durch Autolyse mit Toluol gebildeten.

Beispiel: Hefe der Löwenbrauerei vom Maltasezeitwert 39 lieferte in 24 Stunden einen Auszug, dessen Zeitwert, auf die Hefe bezogen, 25 war, entsprechend 160% Ausbeute. Diese Hefe gab bei der Autolyse mit Toluol in 2 Tagen nur einen Auszug vom Zeitwert 38, also mit 100% Ausbeute.

Zeitschrift für physiologische Chemie 117, S. 172 [1921].

77. ZUR KENNTNIS DES EMULSINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und WILHELM CSÁNYI*.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Mit 2 Abbildungen.)

(Der Redaktion zugegangen am 15. September 1921.)

In den Angaben der Literatur über die Darstellung des Emulsins fehlt die quantitative Prüfung der enzymatischen Leistung und in den zahlreichen Untersuchungen über die Emulsinwirkungen fehlt noch oft die Berücksichtigung und Einstellung der geeigneten Wasserstoffionenkonzentration im Sinne von S. P. L. SÖRENSEN. Daher ist es bisher nicht bekannt, in welcher Ausbeute ein Präparat von Emulsin aus den Mandeln gewonnen werden kann und welche enzymatische Konzentration es im Vergleiche zur Pflanzensubstanz erreicht. In dieser Beziehung versuchen wir nach dem Vorbild der Untersuchung[1] über Peroxydase einen Beitrag zur Kenntnis des Emulsins zu geben. „Die zuverlässige Bestimmungsmethode bildete eine Voraussetzung der präparativen Arbeit. Denn der leitende Gedanke war die analytische Kontrolle der präparativen Methode nach zwei Richtungen: hinsichtlich der Ausbeute im Verhältnis zum angewandten Pflanzenmaterial und in bezug auf den Wirkungswert der Präparate."

Die übliche Isolierung des Emulsins aus Mandeln mit Wasser oder verdünnter Essigsäure ist ungeeignet, da das Emulsin anscheinend durch Adsorptionswirkung in der [173] Pflanzensubstanz festgelegt ist und an Wasser nur schwer abgegeben wird. Bei der Einwirkung von sehr verdünntem Ammoniak lassen sich hingegen die Enzyme in ihrer ganzen Menge freilegen und man gewinnt das Emulsin aus den ammoniakalischen Auszügen in viel größerer Ausbeute und höherem Reinheitsgrad.

Für die quantitative Bestimmung des Emulsins eignet sich von seinen Wirkungen die Hydrolyse des Amygdalins, die auch bisher allgemein zur Schätzung gedient hat. Sie wird durch andere Maße ergänzt, die sich auf die Spaltung von Prunasin, dem Monoglucosid des Benzaldehydcyanhydrins, von β-Methylglucosid, von Lactose und von Raffinose beziehen. Gegen α-Methylglucosid vermochten wir, übereinstimmend

* *Herr Dr. Csányi hat später den Namen „Halden" angenommen.*

[1] R. WILLSTÄTTER und A. STOLL, Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 416, S. 21 [1917/18] (*Abh. 35*).

mit älteren Forschern, unter verschiedenen Bedingungen der Acidität keine Wirkung zu finden.

Als Zeitwerte der Emulsinwirkungen werden die Beträge von Minuten bestimmt, welche 1 mg Emulsin oder emulsinhaltiges Pflanzenmaterial brauchen würde, um 50% der theoretischen Monosemenge aus äquivalenten Mengen der genannten Substrate unter gleichen Bedingungen abzuspalten, indessen in jeder Reaktion bei der für sie günstigsten Wasserstoffionenkonzentration. Das p_H-Optimum liegt für die Amygdalinhydrolyse am nächsten dem Neutralpunkt, für die Lactose- und Raffinosespaltung am weitesten im sauren Gebiet. Beispielsweise wird eines unserer Emulsinpräparate, das freilich durch 6 Monate langes Aufbewahren schon eine starke Einbuße an Wirksamkeit erlitten hatte, gekennzeichnet durch die Zeitwerte 18 für Amygdalinspaltung (10 in frischem Zustand), 11 für Prunasin-, 12200 für β-Methylglucosid-, 26400 für Lactose-, und 140000 für Raffinosehydrolyse.

Die verschiedenen Wirkungen des Emulsins pflegt man damit zu erklären, daß es ein Gemisch mehrerer Enzyme sei. Schon die Zerlegung des Amygdalins ist wahrscheinlich auf die kombinierte Wirkung verschiedener Enzyme zurückzuführen, nämlich nach den Untersuchungen von H. E. ARMSTRONG, E. F. ARMSTRONG und E. HORTON[1] auf das [174] Eingreifen der Amygdalase, die von dem Diglucosid das erste Glucosemolekül abtrennt, und der Prunase, die das Monoglucosid des Mandelsäurenitrils abbaut, das von EMIL FISCHER zuerst aus Amygdalin mit sogenannter Hefemaltase dargestellt und von H. E. ARMSTRONG, E. F. ARMSTRONG und E. HORTON Prunasin genannt wurde. Es ist diesen Forschern gelungen, in den Blättern von Prunus Laurocerasus das Enzym (Prunase) aufzufinden, das Amygdalin nicht anzugreifen vermag, aber aus dem Cyanhydrinmonoglucosid Glucose abspaltet.

Weniger gut gestützt scheint uns bisher die Erklärung der Nebenwirkungen des Emulsins zu sein, der Hydrolyse anderer Glucoside und zusammengesetzter Zucker. E. BOURQUELOT und H. HÉRISSEY[1]) haben zuerst die Milchzuckerspaltung des Emulsins auf eine beigemengte Lactase zurückgeführt, weil die Kefirlactase nicht auf Amygdalin wirkt und weil umgekehrt Emulsin[2]) vorkommt (in Prunus Laurocerasus, Aspergillus niger, Polyporus sulfureus Fr.), das den Milchzucker nicht anzugreifen vermag. Die Verschiedenheit von Emulsinlactase und Kefirlactase ist durch eine Arbeit von H. E. ARMSTRONG, E. F. ARMSTRONG und E. HORTON[3]) noch wahrscheinlicher geworden, die eine Hemmung der ersteren durch Glucose, der Hefelactase durch Galaktose beobachteten. Dennoch wäre es möglich, daß dem Emulsin neben seiner hauptsächlichen Funktion auch weniger ausgeprägte Wirkungen auf andere Polyosen zukämen.

[1] Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 85, S. 359 [1912]. Vgl. auch R. J. CALDWELL und ST. L. COURTAULD, Proc. Roy. Soc. Bd. 79, S. 350 [1907].

[1]) Soc. Biol. Bd. 55, S. 219 [1903].

[2]) Diese Angabe verliert ihre Beweiskraft, wenn man berücksichtigt, daß in diesen Fällen gar nicht das amygdalinspaltende Enzym, sondern z. B. bei Prunus Laurocerasus nur die Prunase vorlag.

[3]) Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 80, S. 321 [1908].

Eine auf Anregung von C. NEUBERG und in seinem Laboratorium ausgeführte Untersuchung von K. OHTA[4] behandelte die Reinigung des Emulsins von Eiweiß, zugleich aber auch von den begleitenden Enzymen, denen die von C. NEUBERG[5] entdeckte Spaltung der Raffinose, ferner die [175] Hydrolyse von β-Methylglucosid und Lactose eigen ist. K. OHTA hat durch Einwirkung von Pankreasferment auf Emulsin gewiß erreicht, Eiweißstoffe daraus zu beseitigen. Aber OHTAS gereinigte Präparate, deren Wirkung auf Amygdalin er als „außerordentlich kräftig" bezeichnet, sind seinen zahlenmäßigen Angaben zufolge so schwach, über tausendmal schwächer[1]) als eines unserer Emulsinpräparate, daß es recht ungewiß ist, ob unter seinen Bedingungen der Prüfung die Wirkung auf Raffinose, β-Methylglucosid und Lactose überhaupt noch bestimmt werden kann.

Die Natur des Emulsins läßt sich klarer erkennen mittels der Methode der Zeitwertquotienten, die vor kurzem in Untersuchungen[2]) über Hefeenzyme eingeführt wurde, um über die Spezifität der kohlehydratabbauenden Enzyme, z. B. über die Verschiedenheit der α-Methylglucosidase von Maltase, der Raffinase von Saccharase zu entscheiden. Die Quotienten der β-Methylglucosid-, Lactose- und Raffinosespaltung zur Amygdalinspaltung, der Lactose- zur Prunasin-, der β-Glucosid- zur Prunasinspaltung und andere Zeitwertverhältnisse werden in süßen und bitteren Mandeln und Aprikosenkernen und in den daraus gewonnenen Präparaten verglichen. Keines der Zeitwertverhältnisse weist einen konstanten Wert auf. Die Schwankungen der Quotienten sind so bedeutend, daß die Emulsinreaktionen als von einander unabhängige Enzymwirkungen und die Emulsinpräparate als veränderliche Gemische sehr zahlreicher glucosid- und polyosenabbauender Enzyme erkannt werden.

[176]

Bestimmungsmethode.

Als Maße für die Wirkungen des Emulsins dienen uns die Zeitwerte der 50proz. Spaltung von Amygdalin, Prunasin, β-Methylglucosid, Lactose und Raffinose und zwar die Anzahl Minuten, welche 1 mg Emulsinpräparat oder enzymhaltige Pflanzensubstanz brauchen würde, um bei 30,0° und optimalem p_H 50% der theoretischen Monosemenge abzuspalten in 20 ccm Lösung aus 0,1000 g Amygdalin (3 H_2O enthaltend) bzw. der äquivalenten Menge von 0,05765 g Prunasin, 0,0793 g β-Methylglucosid (mit $^1/_2$ H_2O), 0,07034 g Lactose (mit 1 H_2O), 0,2320 g Raffinose (mit 5 H_2O). Unter theoretischer Menge werden verstanden 2 Mole Glucose aus Amygdalin, 1 Mol Glucose aus Prunasin, β-Methylglucosid, Lactose, 1 Mol Galaktose aus Raffinose.

4 Biochem. Zs. Bd. 58, S. 328 [1914]. 5 Biochem. Zs. Bd. 3, S. 535 [1907].

1) Während 1 mg unserer frischen Präparate in 10 bis 20 Minuten (Temperatur 30°) aus 1proz. Amygdalinlösung die Hälfte der theoretischen Glucosemenge freizulegen vermag, benötigen 10 mg des von OHTA gereinigten Emulsins 24 Stunden zu ca. 26% Spaltung, sogar bei der Temperatur von 37°; nach unserer Zeitwertdefinition hat das Ohtasche Präparat, von welchem 1 mg 14400 Minuten zu 26,3% Spaltung braucht, also 17:7,2mal länger zu 50%, bei günstigerer Temperatur aber weniger günstigem p_H den Minutenwert 34000.

2) R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 199 [1921] und R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921].

Die optimale Wasserstoffzahl ist, wie im folgenden gezeigt wird, für die Hydrolyse des Amygdalins $p_H = 6$, für Prunasin und β-Methylglucosid 4,9, für Lactose 4,7 und für Raffinose 4,1. Sie wird in allen Fällen mit Acetatgemisch nach L. MICHAELIS[1] eingestellt.

Die Bestimmung der abgespaltenen Hexose mußte sowohl bei den Glucosiden wie bei den zusammengesetzten Zuckern mittels der Reduktionsmethode ausgeführt werden. Ihre Anwendung wird bei den Oxynitrilglucosiden durch die Gegenwart von Blausäure etwas kompliziert. Während K. OHTA[2] ohne Rücksicht auf die Blausäure die abgespaltene Glucose nach PAVY-KUMAGAWA-SUTO bestimmte, hatten R. J. CALDWELL und ST. L. COURTAULD[3] schon früher erkannt, daß dieses analytische Verfahren bei der Bestimmung des Amygdalins versagt, da der Endpunkt durch auftretende Grünfärbung verschleiert wird. Ausführliche Angaben über die Bestimmung enthält die Untersuchung von H. E. ARMSTRONG, E. F. ARMSTRONG und E. HORTON[4]. Die Emulsinwirkung wird mit einem Tropfen Schwefelsäure sistiert, diese mit Kaliumcarbonat [177] neutralisiert und die Flüssigkeit eine halbe Stunde mit Wasserdampf destilliert, ehe die Glucose nach dem modifizierten Allihnverfahren von BROWN, MORRIS und MILLAR bestimmt wurde. Ob unter diesen Bedingungen die Blausäure vollständig entfernt wird, ist nicht ersichtlich. Nach der veröffentlichten Kurve scheint die Spaltung nur zu etwa 80% des theoretischen Glucosegehaltes geführt zu haben.

Wir zogen es vor, aus der schwefelsauren Flüssigkeit, 1 bis 2 ccm 10proz. Schwefelsäure auf 20 ccm enthaltend, die Blausäure mit Wasserdampf abzutrennen, was in 30 Minuten vollständig gelang. Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen der Dampfdestillation das Amygdalin keine meßbare Hydrolyse erleidet. Die Glucose- bzw. Galaktosebestimmung führten wir stets nach G. SONNTAG[1)] und G. BERTRAND[2)] aus. Der größte Fehler[3)] betrug 1%, er blieb innerhalb der Fehlergrenzen der übrigen Vornahmen, z. B. der Dosierung des Enzyms.

Auf diese Weise wurde die abgespaltene Glucose des Amygdalins in ihrer ganzen Menge gefunden, z. B. aus 0,1 g Amygdalin mit 2 mg eines mittelmäßigen Emulsinpräparates bei 30° in 5 Stunden 99% der theoretischen Glucosemenge.

Ausführung. Im Jenaer Rundkolben von $^1/_2$ l Inhalt werden 10 ccm 1,0proz. Amygdalinlösung mit etwas Toluol, mit 2 bis 4 ccm Pufferlösung ($^n/_{10}$-Acetatgemisch im Verhältnis 20 Natrium-ac.: 1 Essigsäure) und so viel Wasser versetzt, daß mit der hinzuzufügenden Enzymlösung das Volumen auf 20,0 ccm kommt, und im Thermostaten

[1] Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914, S. 189.
[2] Biochem. Zs. Bd. 58, S. 329, und zwar S. 335 [1914].
[3] Journ. chem. Soc. Bd. 91, S. 666 [1907].
[4] Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 80, S. 321 [1918].
[1)] Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt Bd. 19, S. 447 [1903].
[2)] Bull. Soc. Chim. (3) Bd. 35, S. 1285 [1906].
[3)] Wenn auch nicht bezweifelt werden soll, daß die Bestimmung nach LING und RENDLE (A. R. LING und TH. RENDLE, Analyst Bd. 30, S. 182 [1905]; A. R. LING und G. C. JONES, Analyst Bd. 33, S. 160 [1908]), noch genauer ist, so finden wir doch die Kritik von W. A. DAVIS und A. J. DAISH (Journ. of Agricult. Science Bd. 5, S. 437, und zwar S. 445 und 468 [1912/13]) übertrieben scharf, welche die Analyse nach BERTRAND „regard as only roughly approximate".

auf 30,0° vorgewärmt. Die Enzymlösung, 1 bis 5 ccm, enthaltend 1/2 bis 5 mg Emulsin, oder die Suspension der Pflanzensubstanz, z. B. von 10 mg Pulver entölter Mandeln, lassen wir unter Umschwenken einlaufen und [178] beginnen die Zeitmessung in der Mitte der Einflußdauer. Eine Vergleichsprobe zur Bestimmung der Eigenreduktion des Emulsins, die übrigens gering, oft ganz unerheblich ist, oder des Pflanzenmaterials wird daneben in gleicher Weise, nur ohne Amygdalin angesetzt. Nach der Reaktionsdauer, gewöhnlich 30 bis 60 Minuten, schalten wir die Emulsinwirkung durch Zusatz von höchstens 2 ccm 10proz. Schwefelsäure aus. Dann wird die Flüssigkeit 30 Minuten lang der Dampfdestillation unterworfen und zwar so, daß das Volumen tunlichst unverändert bleibt, und die Bestimmung nach BERTRAND ausgeführt.

Beispiel. Angewandt wurde ein mit Essigsäure angesäuerter ammoniakalischer Extrakt aus entölten bitteren Mandeln (aus 20 g 500 ccm) und davon zur Messung verwendet 0,2 ccm (nämlich 1 ccm der fünffach verdünnten Lösung) entsprechend 8 mg Mandelpulver. Einwirkung auf 0,1 g Amygdalin während 60 Minuten. Nach BERTRAND wurden verbraucht 6,6 ccm 0,156 n-Permanganatlösung. Daraus ergaben sich 33,4 mg Glucose, d. i. 47,5% Spaltung. Für diesen Spaltungsgrad würde 1 mg nach der Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Enzymmenge 480 Minuten erfordern. Aus der Reaktionskurve der Amygdalinspaltung (Abb. 2) ergibt sich zum Spaltungsgrad von 47,5 der zugehörige Abszissenpunkt 15,6, also zum Abszissenpunkt 17 der 50proz. Spaltung die Zeit von 523 Minuten. Dies ist der Zeitwert der aus 1 mg entölter Mandeln gewonnenen Emulsinlösung.

Ebenso wurden die entölten Mandeln selbst analysiert, nämlich aufgeschlämmte 8 mg, indem wir 0,4 g anteigten, auf 100 ccm auffüllten und davon 2 ccm zur Bestimmung anwandten. Perm. (0,152 n) gef. 4,4 ccm entsprechend 21,28 mg Glucose und $30^1/_4$% Spaltung. Daraus Zeitwert 480. Die Emulsinausbeute unseres Beispiels im Extrakte betrug 480:523 = 92%.

Zur Bestimmung der Emulsinausbeute wenden wir ähnlich wie beim Invertin nach R. WILLSTÄTTER und F. RACKE (Ann. d. Chem., im Druck) einen Menge-Zeit-Quotienten an, der Enzymmenge proportional, additiv, nämlich den Quotienten des in irgendeiner Form vorliegenden emulsinhaltigen Materials [179] (mg) und seiner Wirkungszeit. Z. B. lieferten 20 g Mandeln vom Zeitwert 480 (M:Z = 41,7) 0,55 g Emulsin vom Zeitwert 18 (M:Z = 30,6); Ausbeute 73,5%.

Die Bestimmung der übrigen quantitativ weit geringeren Wirkungen des Emulsins wird mit viel mehr Enzym ausgeführt, z. B. mit der 20- bis 100fachen Menge (50 bis 250 mg Emulsin oder 500 mg Pulver von Mandeln), und mit viel größerer Zeitdauer, z. B. 6 bis 40 Stunden. Auch wird die Puffermenge hier vermehrt, gewöhnlich auf 5 ccm n-Acetatmischung. Die Mengen der Substrate sind äquivalent, nämlich

10 ccm 0,7930proz. Lösung von β-Methylglucosid (wasserhaltig),

10 ccm 0,7034proz. Lösung von Lactosehydrat,

10 ccm 2,320proz. Lösung von Raffinose (wasserhaltig), die mit Puffer und Enzym auf 20 ccm gebracht werden.

Nur im Fall der Raffinose war auch ohne Enzym die Hydrolyse des Substrates bei der in Betracht kommenden Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 4{,}1$ und der langen Dauer schon beträchtlich. Daher sind hier zwei Vergleichsproben zur Korrektur der Kupferwerte nötig, die eine mit äquivalenter Raffinoselösung und dem nämlichen Puffer wie im Versuch, die andere mit der Emulsinlösung + Puffer.

Die enzymatische Reaktion unterbrachen wir in diesen Fällen, wo keine Dampfdestillation nötig war, durch Zufügen der alkalischen Seignettesalzlösung.

Bei der Lactose ist die Spaltung nicht so einfach zu verfolgen wie bei den übrigen Substraten, da ja die Lactose selbst Reduktionsvermögen besitzt und zwar etwa $^7/_{10}$ von der Reduktionswirkung nach Hydrolyse. Es war am einfachsten, der Bestimmung den Verbrauch von Permanganat nach BERTRAND zugrunde zu legen, den wir z. B. für

0 %	Spaltung von 0,07034 g	Lactosehydrat	= 8,50 ccm
50 %	,, ,, 0,07034 g	,,	= 10,30 ccm
100 %	,, ,, 0,07034 g	,,	= 12,10 ccm

Permanganat (0,154 n) ermittelten. Genauere Angaben über die Analyse des Gemisches aus Lactose und ihrer Komponenten enthält eine nachfolgende Arbeit* von R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER. [180] Mit den Spaltungsäquivalenten der Permanganatzahlen war es möglich, die aus den gefundenen Permanganatwerten abgeleitete Reaktionskurve für Prozente gespaltener Lactose zu eichen. Diese Umwertung vereinfacht sich dadurch, daß die Reaktionskurve sich als genau logarithmisch erweist.

Optimale Wasserstoffionenkonzentrationen.

Die meisten Untersuchungen über Emulsin sind noch ohne Berücksichtigung der Reaktion des Mediums ausgeführt worden. Schon 1909 haben C. S. HUDSON und H. S. PAINE[1] für die Salicinhydrolyse mit Emulsin schwach saure Reaktion ($^5/_{1000}$ n-HCl) als optimal erkannt[2], allerdings ohne Anwendung von Puffern. Unter Verwendung von Puffern im Sinne von SÖRENSEN untersuchte E. VULQUIN[3] die Wirkung von Emulsin auf Amygdalin und Salicin und fand optimale Wirkung auf Amygdalin bei $p_H = 5{,}4$ bis $5{,}7$, auf Salicin bei $4{,}4$. Zu derselben Zeit aber gaben G. BERTRAND und A. COMPTON[4] an, die Amygdalinspaltung verlaufe optimal in schwach alkalischem Medium, und an diese Beobachtung knüpfen G. BERTRAND und A. COMPTON[5] in einer vor kurzem erschienenen Arbeit an, in der sie beim Altern des Emulsins eine Verschiebung des Wirkungsoptimums vom schwach alkalischen in saures Gebiet finden. Das Emulsin dieser Autoren dürfte frisch reicher, das von VULQUIN ärmer an Amygdalase gewesen sein als unsere Präparate; beim Altern des Emulsins von BERTRAND und COMPTON scheint vorwiegend Amygdalase zerstört worden zu sein.

* *Abh. 64.* [1] Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 31, S. 1242 [1909].

[2] Nach S. J. M. AULD (Jl. Chem. Soc. Bd. 93, S. 1251 [1908]) sollte für die Amygdalinspaltung neutrales Medium am günstigsten sein.

[3] Soc. Biol. Bd. 70, S. 270 u. 763 [1911].

[4] C. R. Bd. 153, S. 360 [1911].

[5] Bull. Soc. chim. France (4), Bd. 29, S. 229 [1921].

Für die Spaltung von Prunasin, ferner von Lactose und Raffinose durch Emulsin enthält die Literatur keine Angaben über die Abhängigkeit von der Reaktion des Mediums; hinsichtlich der Lactosespaltung werden gewisse Ergebnisse von [181] H. E. ARMSTRONG, E. F. ARMSTRONG und E. HORTON[1] durch diesen Mangel beeinträchtigt. Für die Spaltung der β-Glucoside hat EMIL FISCHER[2] in seiner letzten Arbeit über den „Einfluß der Struktur der β-Glucoside auf die Wirkung des Emulsins" „die für das Emulsin als günstig bekannte Konzentration von etwa 10^{-5}" benützt.

Amygdalin. Phosphat- und Acetatpuffer wirken übereinstimmend.

12,5 mg Mandelpulver ergaben mit 0,1 g Amygdalin in 60 Minuten

bei p_H 6 mit Phosphatmischung 60,3% Spaltung,
„ p_H 6 „ Acetatmischung 60,7% „

Die Abhängigkeit der Amygdalinspaltung vom p_H ermittelten wir mit 2 mg Emulsin vom Zeitwert 31 bei 1 stündiger Einwirkung auf 0,1 g Amygdalin (Tab. 1): Optimum zwischen 5 und 6,5, in saurer Lösung von $p_H = 3$ (wie $^n/_{1000}$-HCl) wirkungslos, in spurenweise alkalischer Lösung ($p_H = 9$, Borat + Salzsäure) schwache Wirkung.

Tabelle 1. Amygdalinspaltung bei verschiedenen Wasserstoffzahlen.

p_H	Permanganat 0,156 n ccm	Spaltung %	$10^2 \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$\frac{q}{q_0}$
3	0	0		—
4	8,5	62	42,0	0,40
5	11,5	87	88,6	0,85
6	12,0	91	104,6	1,00
7	10,1	75	60,2	0,58
8	5,2	37	20,1	0,19
9	1,5	10	4,6	0,04

Für das Gebiet von $p_H = 5$ bis 6,5 wurden zwischenliegende Aciditäten in einer zweiten Versuchsreihe (Tab. 2) unter Anwendung von 1 mg Emulsin geprüft und das Optimum genauer bei $p_H = 6$ gefunden.

[182] Tabelle 2. Amygdalinspaltung zwischen p_H 5 und 6,5.

Puffer Mischungszahlen	p_H	Permanganat 0,156 n ccm	Spaltung %
5 Natriumacetat 4 Essigsäure.	5,0	8,5	62,3
0,4 sek. Phosphat 9,6 prim. „ . .	5,5	8,6	63,1
1,2 sek. Phosphat 8,8 prim. „ . .	6,0	9,8	72,5
2,0 sek. Phosphat 8,0 prim. „ . .	6,25	9,0	66,25
3,0 sek. Phosphat 7,0 prim. „ . .	6,5	8,8	65,0

[1] A. a. O. [2] Diese Zs. Bd. 107, S. 176 [1919].

Die Abb. 1 zeigt die Abhängigkeit der Emulsinwirkungen auf Amygdalin, Lactose und Raffinose von der Acidität und zwar so, daß gemäß der Annahme von L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN[1], wonach „bei jeder der optimalen Wasserstoffzahl

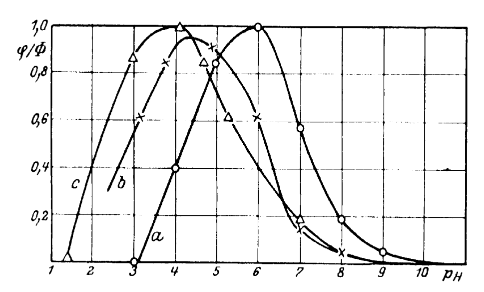


Abb. 1. p_H-Wirkungskurve des Emulsins.
Spaltung a von Amygdalin, b von Lactose, c von Raffinose.

nicht entsprechenden Acidität nur ein Bruchteil des vorhandenen Ferments in wirksamer Form zugegen ist", dieser [183] Bruchteil (φ/Φ) in seiner Abhängigkeit vom Wasserstoffexponenten dargestellt wird.

Prunasin. Für die Prunasewirkung des Emulsins liegt nach einigen orientierenden Versuchen das Optimum bei etwas größerer Acidität, nämlich bei p_H = ungefähr 4,4.

60 mg Prunasin mit 1 mg Emulsin in 30 Minuten.

$p_H = 6,0$	Permanganat gef.	5,3 ccm	Spaltung	74 %
$p_H = 4,9$	„ „	5,9 ccm	„	83 %
$p_H = 4,1$	„ „	5,7 ccm	„	80 %

β-Methylglucosid. Für dieses Substrat ist Emulsin einerseits bei $p_H = 3$ wirkungslos, andererseits bei neutraler Reaktion schon sehr schwach wirkend. Die optimale Zone liegt von $p_H = 4,7$ bis 5,1.

In einer Versuchsreihe (Tab. 3) ließen wir 10 mg Emulsin vom Zeitwert 54 für Amygdalin und 10800 in bezug auf β-Methylglucosid auf 80 mg Glucosid 13 Stunden bei 30° einwirken. Für Nr. 1 diente Glykokoll + Salzsäure, für 2 und 3 Citrat + Salzsäure, für 4 und 5 Phosphatmischung als Puffer.

Tabelle 3. Hydrolyse von β-Methylglucosid zwischen $p_H = 3$ und 8.

Nr.	p_H	Permanganat 0,154 n ccm
1	3,0	0
2	4,0	6,6
3	4,5	7,8
4	7,0	0,3
5	8,0	0

[1] Biochem. Zs. Bd. 35, S. 386 [1911].

Die zweite Versuchsreihe (Tab. 4) erstreckte sich nur auf das Gebiet der günstigsten Glucosidasewirkung; von demselben Emulsinpräparat wurden 40 mg 6 Stunden bei Gegenwart von Acetatpuffer zur Einwirkung gebracht.

[184] Tabelle 4. β-Glucosidasewirkung bei günstigem p_H.

Na-Acetat-essigsäure Mischzahlen	p_H	Permanganat 0,154 n ccm	Spaltung %
1/4	4,1	7,5	53,6
1/2	4,4	8,1	58,1
2/1	5,0	8,4	60,4
4/1	5,3	8,0	57,3
8/1	5,6	7,5	53,6

Lactose. Die Emulsinwirkung ist auch hier bei neutraler Reaktion schwach, dagegen noch bedeutend bei $p_H = 3$; darin erinnert die Lactase an die Mandelraffinase, die bei dieser Acidität noch beinahe optimal wirkt. Das Optimum der Lactosespaltung liegt scharf bei 4,2 bis 4,6. Die in der Tabelle 5 mitgeteilte Versuchsreihe ist mit 100 mg Emulsin vom Zeitwert 93 für Amygdalin, 111000 für Lactose ausgeführt; 70 mg Lactose, 30°, 16 Stunden. Die Puffer waren Acetatmischungen, nur bei $p_H = 1$ und 8 Phosphate.

Tabelle 5. Abhängigkeit der Lactosespaltung von der Wasserstoffzahl.

p_H	Permanganat 0,154 n ccm	Spaltung %	$\frac{10^3}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$\frac{\varphi}{\Phi}$
3,2	9,6	30	9,7	0,62
3,8	9,9	39	13,4	0,85
4,4	10,1	44	15,7	1,00
4,9	10,0	41	14,3	0,91
6,0	9,6	30	9,7	0,62
7,0	8,8	8,5	2,3	0,145
8,0	8,6	2,5	0,7	0,045

Raffinose. Die Wirkungskurve des Mandelenzyms für Raffinosespaltung steigt von $p_H = 3$ zum Optimum an, das bei 4,1 liegt, und fällt gegen $p_H = 4,7$ hin steil ab. Die Kurve verläuft bei dieser Galaktoraffinase anders als bei der [185] Fructoraffinase der Hefe[1], der Abfall im stärker sauren Gebiet wie auch gegen den Neutralpunkt hin ist nämlich viel steiler.

In der Versuchsreihe der Tab. 6 wirkten 100 mg Emulsin vom Zeitwert 93 für Amygdalin, 142000 für Raffinose bei 30° 40 Stunden auf 200 mg Raffinose. Die Puffer waren Acetatgemische, nur bei $p_H = 1,5$ und 3 war Glykokoll + Salzsäure angewandt. Der Anstieg der Kurve im günstigen Gebiet wurde durch ergänzende Bestimmungen mit Acetatpuffer nachgeprüft.

[1] R. Willstätter und R. Kuhn, Diese Zs. Bd. 115, S. 180, und zwar S. 186 [1921].

Tabelle 6. Abhängigkeit der Emulsin-raffinase von der Wasserstoffzahl.

p_H	Permanganat 0,154 n ccm	Spaltung %	$\frac{10^3}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$\frac{\varphi}{\Phi}$
1,5	0,3	2,0	0,23	0,01
3,0	10,5	80,5	17,75	0,87
4,1	11,0	84,6	20,30	1,00
4,7	10,4	79,6	17,25	0,85
5,3	9,0	68,5	12,55	0,62
7,0	4,0	29,3	3,78	0,19

Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge.

Von den Wirkungen des Emulsins legen wir die Amygdalinspaltung im allgemeinen der Ermittlung der Enzymausbeute in Lösungen und Präparaten und der Bestimmung des Reinheitsgrades, d. h. der Enzymkonzentration in den Präparaten zugrunde. Die quantitative Bestimmung der Zeitwerte setzt aber voraus, daß für einen gegebenen Umsatz das Produkt aus Enzymmenge und Reaktionszeit konstant ist. Bei der Spaltung des Amygdalins erwies es sich nun in allen Fällen in dem praktisch in Betracht kommenden Bereich und darüber hinaus als [186] zutreffend[1], daß sich die Zeiten gleichen Umsatzes umgekehrt wie die Enzymmengen verhalten.

Auch die Hydrolyse des β-Methylglucosids, der Lactose und der Raffinose prüften wir in dieser Beziehung, zumeist im Bereich von 1:10, und fanden, wie die Tab. 7 zeigt, die Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge erfüllt.

Tabelle 7. Enzymkonzentration und Umsatz.

Substrat	Emulsin mg	Zeit	Permanganat ccm	Spaltung %
Amygdalin . .	0,5	60 Min.	5,62	40,10
1. Versuch . .	1,0	30 ,,	5,65	40,37
Amygdalin . .	0,5	120 ,,	8,5	62,27
2. Versuch . .	1,0	60 ,,	8,3	60,70
	5,0	12 ,,	8,5	62,27
β-Methylglucosid	10	15 Std.	6,05	42,65
1. Versuch . .	50	3 ,,	6,15	43,35
β-Methylglucosid	100	2 ,,	5,35	37,6
2. Versuch . .	200	1 ,,	5,30	37,5
Lactose	20	80 ,,	10,2	47
	40	40 ,,	10,2	47
	100	16 ,,	10,1	44
	200	8 ,,	10,0	42
Raffinose . . .	20	65 ,,	4,3	32,0
	200	6½ ,,	4,2	31,0

Da diese Nebenwirkungen des Emulsins, die Spaltungen der zusammengesetzten Zucker, vergleichsweise sehr schwach sind, so wäre es von Wert, in diesen Fällen die

[1] S. J. M. Auld (Jl. Chem. Soc. Bd. 93, S. 1251 [1908]) war zu dem Ergebnis gekommen, daß lediglich bei geringer Emulsinkonzentration die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Amygdalin proportional der Enzymmenge sei. Vgl. auch H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und E. Horton, Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 80, S. 321 [1908]. Diese Einschränkung fanden wir indessen nicht bestätigt.

Prüfung der Proportionalität auf einen viel größeren Bereich auszudehnen, was aber durch das Erfordernis sehr großer Enzymmengen und sehr langer Versuchszeiten erschwert wird. Aus den [187] Beobachtungen der Hydrolyse, die z. B. mit 100 bis 500 mg Enzympräparat ausgeführt sind, werden Zeitwerte abgeleitet, die sich gemäß der Definition auf die Wirkung von 1 mg beziehen. Es läßt sich nicht vermeiden, daß durch diese Umrechnung, welche die strenge Proportionalitätsbeziehung voraussetzt, die Zeitwerte für die schwachen Emulsinwirkungen ungenau werden. Ohnedies sind diese nur viel weniger genau zu bestimmen als die Hauptwirkungen des Emulsins, weil in den erforderlichen langen Bestimmungszeiten die Reduktionswirkung in den Kontrollproben (z. B. bei der Analyse der Mandeln in den Suspensionen der Pflanzensubstanz) einen ansehnlichen Bruchteil im Vergleich zur Bestimmungslösung ausmacht.

Zur Kinetik der Emulsinwirkungen.

Über die Kinetik der Wirkungen von Emulsin auf β-Methylglucosid, Lactose[1] und Raffinose finden sich keine Aufschlüsse in der Literatur. Unsere Beobachtungen über den zeitlichen Verlauf dieser Reaktionen, die in den Tab. 8, 9 und 10 verzeichnet sind, lassen erkennen, daß sich diese Hydrolysen dem Gesetz der monomolekularen Reaktion fügen.

Tabelle 8.
Zeitlicher Verlauf der β-Methylglucosidspaltung. (0,8proz. Glucosidlösung, 100 mg Emulsin, $p_H = 4,4$; 30°.)

Zeit Stunden	Permanganat 0,154 n ccm	Spaltung %	$\frac{10^4}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
2	1,2	7,1	370
16	6,8	48,35	410
19	8,0	57,45	450
23	8,6	62,0	420
26	9,0	65,4	410
41	11,0	81,0	400
48	11,4	84,2	380

[188]
Tabelle 9.
Verlauf der Lactosespaltung. (0,7proz. Lösung, 500 mg Emulsin, $p_H = 4,4$; 30°.)

Zeit Stunden	Permanganat 0,154 n ccm	Spaltung %	$\frac{10^4}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
4	9,1	15	410
7	9,4	24	390
21	10,5	55	380
24	10,7	61	390
30	11,0	69,5	396
46	11,55	85	410

[1] Die Versuche von H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und E. Horton behandelten noch ohne Einstellung günstiger Acidität den Einfluß des Verhältnisses zwischen der Menge von Mandellactase und der Lactosemenge, ohne zu einem brauchbaren Ausdruck für die Reaktionsgeschwindigkeit zu gelangen.

Tabelle 10. Verlauf der Raffinosespaltung. (2,3proz. Lösung, 1 g Emulsin, $p_H = 4,2$; 30°.)

Zeit Stunden	Permanganat 0,154 n ccm	Spaltung %	$\frac{10^4}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
1	0,5	3,5	351
2¹/₂	1,15	8,5	355
6	2,5	18,0	330
9	3,5	25,6	328
22¹/₂	7,3	55,2	350
26	8,0	60,5	356
30¹/₂	8,7	66,0	352

Demnach stimmen die Enzyme des Emulsins, welche die Lactose, Raffinose und das β-Methylglucosid spalten, in ihrer Kinetik mit der Saccharase und Raffinase aus Hefe überein, also diejenigen Mandelenzyme und diejenigen Hefeenzyme, deren Wirkungsoptimum in ausgesprochen saurem Gebiete liegt. Auch für die Spaltung des Salicins durch Emulsin gilt das nämliche; diese ebenfalls in saurem Medium am besten erfolgende Hydrolyse zeigt nach C. S. HUDSON und H. S. PAINE[1] den Verlauf einer monomolekularen Reaktion.

Anders steht es um den zeitlichen Verlauf der Amygdalinspaltung, der in der Tab. 11 und in der [189] Reaktionskurve, Abb. 2, dargestellt wird, mittels deren wir aus den jeweils beobachteten Spaltungsgraden die der 50proz. Spaltung entsprechenden Zeiten ermitteln. Hier fällt die Geschwindigkeitskonstante im Verlaufe der Hydrolyse ab. Mit dieser Emulsinreaktion verhält es sich indessen nicht ganz so wie mit den Hydrolysen der Maltose und des α-Methylglucosids durch Hefeenzyme, die einen vom monomolekularen Gesetz noch mehr abweichenden Verlauf nehmen. Aber eine gewisse Analogie besteht auch hier in der Kinetik der Enzyme, die bei ähnlicher Wasserstoffionenkonzentration optimal wirken, nämlich bei spurenweise saurer und bei schwach saurer Reaktion.

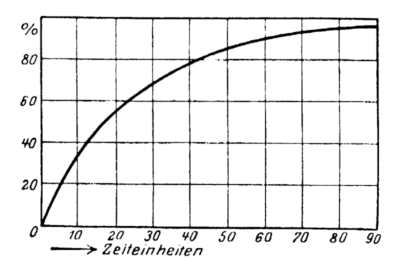


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Amygdalin-Glucose-Spaltung ($p_H = 6$; 30°).

Tabelle 11.
Kinetik der Amygdalinhydrolyse. (1proz. Lösung; 2,5 mg Emulsin. $p_H = 6$; 30°.)

Zeit Minuten	Permanganat 0,156 n ccm	Spaltung %	$\frac{10^5}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
12	1,0	6,68	575
24	1,57	10,95	483
40	2,10	14,50	492
60	3,15	22,03	414
90	4,50	31,84	425
120	5,50	39,24	415
180	7,15	51,75	404
1200	12,65	96,00	257

[1] Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 31, S. 1242 [1909].

Hinsichtlich der Abspaltung von Glucose aus Amygdalin ist zu berücksichtigen, daß es sich nicht um eine einfache [190] Reaktion handelt, sondern um kombinierte Amygdalase- und Prunasewirkung und daß die für die gesamte Glucosebildung günstigsten Bedingungen ($p_H = 6$) für jede der beiden enzymatischen Teilreaktionen, besonders die der Prunase, nicht optimal sind.

Auch frühere Autoren[1] kamen hinsichtlich der Kinetik der Amygdalinhydrolyse zu Abweichungen vom monomolekularen Verlauf; diese älteren Untersuchungen können aber für den Zweck der Zeitwertbestimmung nicht herangezogen werden, da sie nicht bei günstigster Acidität und nicht in genau definiertem Medium vorgenommen sind.

Darstellung des Emulsins.

Emulsin wird bisher durch Ausziehen von Mandeln mit Wasser gewonnen und zwar ein unbekannter Bruchteil der vorhandenen Enzymmenge; unbekannt ist auch die Erhöhung der Enzymkonzentration von den Mandeln zum Präparat.

Die ältesten Vorschriften für die Darstellung von F. WÖHLER und J. LIEBIG[2] und von P. ROBIQUET[3] werden, nur geringfügig modifiziert, noch allgemein benützt. Nach E. BOURQUELOT[4] und H. HÉRISSEY[5] werden süße Mandeln enthäutet, zerstoßen und mit der doppelten Menge von mit Chloroform halbgesättigtem Wasser 24 Stunden maceriert. Nach dem Kolieren wird der Auszug durch Ansäuern mit etwas Essigsäure vom Eiweiß („Casein") befreit und mit dem 4fachen Volumen Alkohol gefällt. Nach H. E. ARMSTRONG, E. F. ARMSTRONG und E. HORTON[6] verwendet man süße oder bittere Mandeln, die in Brei verwandelt, durch Pressen (freilich unvollkommen) entölt und 24 bis 48 Stunden mit dem Doppelten oder [191] Dreifachen an Toluolwasser ausgezogen werden, am besten bei 10 bis 20°. Aus dem Filtrat wird wieder mit ein wenig Essigsäure Albuminoid beseitigt, ehe es mit nur dem gleichen Volumen Alkohol gefällt wird. Das Ausziehen des Emulsins nimmt man auch mit verdünnter Essigsäure vor, um die durch sie koagulierbaren Proteine fernzuhalten; z. B. sollen nach D. H. WESTER[1]) die zerkleinerten, aber nicht entölten Mandeln mit nur dem gleichen Gewicht 1proz. Essigsäure maceriert werden.

Um mit Wasser oder Essigsäure einen einigermaßen beträchtlichen Anteil des Emulsins zu gewinnen, ist aber viel mehr Lösungsmittel nötig. Mit der fünffachen Menge 1proz. Essigsäure vermochten wir durch 24stündiges Macerieren z. B. 29,

---

[1] Vgl. S. J. M. AULD (a. a. O.), der die Spaltung des Amygdalins durch Blausäurebestimmung gemessen hat, und H. E. ARMSTRONG, E. F. ARMSTRONG und E. HORTON (a. a. O.), die den Verlauf der Hydrolyse sowohl durch Bestimmung der Glucose wie der Blausäure verfolgten.

[2] Liebigs Ann. der Chem. Bd. 22, S. 1 [1837].

[3] Jl. Pharm. et Chim. (2) Bd. 24, S. 326 [1838]; vgl. Liebigs Ann. der Chem. Bd. 28, S. 289 [1838].

[4] Arch. d. Pharmazie Bd. 245, S. 172 [1907].

[5] Thèse, Paris 1899.

[6] Proc. Roy. Soc., Ser. B, Bd. 80, S. 321, und zwar S. 324 [1908].

[1]) Anleitung zur Darstellung phytochem. Übungspräparate, Berlin 1913, S. 120.

mit dieser Menge Essigsäure-Natriumacetatgemisch von $p_H = 6$ z. B. 32% des Emulsins der Mandeln in Lösung zu bringen, wenn diese gänzlich entölt waren.

Der Reinheitsgrad der Emulsinpräparate läßt sich steigern, wenn sie nach dem Trocknen in Wasser aufgelöst, wobei unlöslich gewordenes Protein mit einem nur geringen Gehalt an Emulsin zurückbleibt, und nochmals mit Alkohol gefällt werden. Mit dieser Reinigung und bei Anwendung der größeren Lösungsmittelmengen erhielten wir z. B. aus 18,7 g entölten, bitteren Mandeln 0,3 g umgeschiedenes Emulsin vom Zeitwert 31,4, entsprechend 22% Ausbeute.

Die unbefriedigende Ausbeute wird dadurch verschuldet, daß das Emulsin von der Pflanzensubstanz an Wasser oder Essigsäure zu schwierig abgegeben wird. Es scheint in ihr durch Adsorption festgelegt zu sein. Beim Behandeln mit sehr verdünntem Ammoniak gelingt es aber, das Emulsin freizulegen und in guter Ausbeute zu isolieren. Zugleich wird dabei das Verhältnis zwischen den Enzymen und den Begleitstoffen verbessert, der Reinheitsgrad der Präparate schon vor dem Umscheiden günstiger. Die Alkalimenge, die von der Pflanzensubstanz bis zum Eintritt alkalischer Reaktion aufgenommen wird, ist so bedeutend, daß man die Mandeln zweckmäßig mit dem $2^1/_2$fachen von $^n/_{10}$-Ammoniak behandelt. Die praktische [192] Ausbeute (ungerechnet die in den Mandelrückständen hinterbleibenden Anteile der Enzymlösung) in den ammoniakalischen Auszügen läßt sich erst nach dem Ansäuern mit Essigsäure durch die Zeitwertmessung bestimmen. Sie betrug nach dem Ausfällen von Eiweiß in einigen Versuchen 85, 90, 82 und 88%.

Die Mandeln werden zunächst in trockenes, ölfreies Pulver verwandelt. Um sie zu enthäuten, erwärmt man sie eine Viertelstunde in Wasser von 60 bis 70°. Man trocknet sie oberflächlich an der Luft, zerkleinert sie in der Mandelmühle und entzieht ihnen in der hydraulischen Presse die Hauptmenge des Öls. Darauf werden sie mit dem Dreifachen an Äther in einer Flasche extrahiert, nach dem Absaugen in der Walzenmühle gemahlen und nochmals mit der doppelten Menge Äther ausgezogen, abgesaugt und nachgewaschen. Das in einem warmen Luftstrom getrocknete Material wird in einer Siebmühle aufs feinste gemahlen. An Pulver, das für die Bestimmungen im Vakuumexsiccator zu trocknen ist, erhält man etwa ein Drittel vom Gewicht der Mandeln. Beim Aufbewahren nimmt es an enzymatischer Wirkung ab, z. B. in einem halben Jahre um 10%.

Verschiedene Proben von ölfreiem Pulver aus süßen wie aus bitteren Mandeln ergaben ziemlich übereinstimmende Zeitwerte für Amygdalinspaltung: 425, 480 und 500.

100 g Mandelpulver verrühren wir in einer Flasche mit 250 ccm $^n/_{10}$-Ammoniak und schütteln nach Verdünnen mit weiteren 100 ccm Wasser 5 Stunden lang mit der Maschine. Den ammoniakalischen Auszug trennt man am besten mittels der Zentrifuge von den Rückständen, um diese sogleich in den Zentrifugengläsern wieder mit 100 ccm Wasser unter Zusatz von 10 ccm $^n/_{10}$-Ammoniak anzurühren, von neuem zu zentrifugieren und ebenso einen dritten Auszug zu bereiten, abermals, falls die alkalische

Reaktion verschwunden ist, unter Zusatz einiger Kubikzentimeter Ammoniak. Die vereinigten Auszüge, etwa $^1/_2$ l, enthalten 60% der Trockensubstanz der Mandeln. Einen großen Teil der Eiweißstoffe, etwa 8% vom Pflanzenmaterial, fällen wir, wie üblich, mit verdünnter Essigsäure (300 ccm $^n/_{10}$ oder 60 ccm $^n/_2$) aus; der Niederschlag enthält 5 bis 8% vom Emulsin

[193] Das Filtrat gibt schon mit wenig 95proz. Alkohol (30% seines Volumens) eine Fällung, die hauptsächlich aus Eiweiß und Gummi besteht, aber auch ca. 20% der Enzyme einschließt. Trennt man diese Fraktion ab, so wird das Rohprodukt des Emulsins reiner. Aber da für das Präparat doch eine Umfällung erforderlich ist, bewährt es sich nicht, die etwas verlustbringende fraktionierte Fällung vorzunehmen. Daher fällen wir die Lösung mit der 4fachen Menge Sprit und isolieren mittels der Zentrifuge den rein weißen Niederschlag, der mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen wird.

In der essigsauren Lösung, auch in 30% Alkohol enthaltender, ist das Emulsin praktisch beständig. Gegenwart von Alkohol hemmt die Amygdalinspaltung deutlich, 10% Alkohol in der Reaktionsflüssigkeit erniedrigt die Wirkung um etwa ein Viertel.

Das Rohprodukt betrug exsiccatortrocken 2,5 bis 3,5 g, beispielsweise vom Zeitwert 25, 22, 18, 16, was Ausbeuten von etwa 60 bis 75% der Theorie entspricht.

Durch die Fällung und Trocknung ist ein Teil des noch beigemengten Proteins unlöslich geworden. Daher läßt sich der Reinheitsgrad leicht durch Umscheiden verbessern. Das feine Pulver teigt man mit wenig Wasser in der Reibschale an und spült es mit dem Dreißigfachen von Wasser in die Zentrifugengläser über, in denen die Lösung geklärt wird. Darauf fällt man das Emulsin zum zweiten Male mit Alkohol, wenn es für die Ausflockung nötig ist unter Zusatz einer Spur Calciumchlorid. Diese Reinigung ließ sich fast ohne Verlust ausführen, die umgefällten Präparate wiesen Zeitwerte von 10 bis 18 auf.

Während ein Handelspräparat, für das wir z. B. den Zeitwert 130 ermittelten, gut haltbar ist, fanden wir die guten Emulsinpräparate schlecht haltbar, namentlich die durch Umscheiden gereinigten hochwertigen Präparate. Ein Rohprodukt vom Zeitwert 22 hielt sich über einen Monat unverändert, aber in 0,05proz. Lösung (toluolhaltig) verschlechterte es sich zum Zeitwert 42,5. Bei einem umgefällten Präparat verschlechterte sich der Zeitwert 18 in $3^1/_2$ Monaten zu 25, in [194] weiteren $2^1/_2$ Monaten zu 54; ein anderes Präparat erlitt Einbuße an Wirksamkeit, entsprechend den Zeitwerten 10 : 18.

Die Emulsinpräparate sind in Wasser klar löslich, hellbräunlich bei großer Konzentration. Die Lösung wird durch Salzsäure gefällt. Das Emulsin zeigt auch nach langem Erwärmen mit Wasser keine reduzierende Wirkung auf Fehlingsche Lösung, während dies nach C. Neuberg und F. Marx[1] bei Handelspräparaten gefunden wird. Dagegen tritt noch bei langdauerndem Erwärmen mit verdünnter Säure etwas Reduktionswirkung auf. Man findet stets noch schwache Millon- und Biuretreaktion und Xanthoproteinreaktion. Ein Präparat vom Zeitwert 18 zeigte $[\alpha]_D = -60°$.

[1] Biochem. Zs. Bd. 3, S. 535, und zwar S. 538 [1907].

Quotienten der Emulsinwirkungen in Mandeln und Präparaten.

In einigen Beispielen von Zeitwertbestimmungen, nämlich für die Emulsinwirkungen auf Amygdalin, Prunasin, β-Methylglucosid, Lactose und Raffinose, beginnen wir die enzymatische Analyse der als Ausgangsstoffe für Emulsin in Betracht kommenden bitteren und süßen Mandeln und Aprikosenkerne (Tab. 12 und 14) und die enzymatische Beschreibung von Emulsinpräparaten (Tab. 13 und 15). Diese Analyse muß ausgestaltet und in größerem Maßstab, nämlich mit zahlreicheren Proben fortgesetzt und auf eine größere Zahl von Substraten ausgedehnt werden. Sie ergibt zunächst das Verhältnis der verschiedenen enzymatischen Wirkungen in Pflanzenstoffen und Präparaten. Damit ist zwar das Verhältnis der Mengen der entsprechenden Enzyme nicht gegeben, aber da die Enzyme in so hohem Maße spezifische Reagenzien für den Abbau von Polyosen und Glucosiden sind, so ist es wahrscheinlich, daß gleichen hydrolytischen Wirkungen auch ähnliche oder vergleichbare Konzentrationen der Enzyme entsprechen.

Die quantitative Untersuchung der Mandeln wird darüber Aufschluß geben, welche Ausgangsstoffe für die einzelnen Komponenten des unter dem Namen Emulsin bekannten Gemisches besonders geeignet sind. Nach dem vorliegenden noch spärlichen Material erscheinen z. B. die Aprikosenkerne für die [195] Galaktoraffinase als ein günstigeres Material wie Mandeln (Zeitwert 300000 statt 600000).

Ein Hauptzweck der Analyse war, zu prüfen, ob für jeden einzelnen Fall der Hydrolyse ein spezifisches Enzym hervorgebracht wird. Wenn einem Enzym die Fähigkeit zukommt, mehrere Substrate, wie Zucker oder Glucoside zu spalten, so werden sich gleiche Zeitwertquotienten dafür ergeben bei verschiedenen Ernten oder Proben desselben pflanzlichen Ausgangsmaterials oder bei verschiedenen pflanzlichen Ausgangsstoffen oder beim Vergleich von frischem und gealtertem Pflanzenmaterial oder beim Vergleich des Pflanzenmaterials und der daraus gewonnenen Präparate oder bei Präparaten nach gewissen Fraktionierungen, Präparaten von verschiedenem Reinheitsgrad, Präparaten von ungleichem Alter.

Für dieses Ziel der Untersuchung war es daher unerheblich, ob das Pflanzenmaterial und ob das Emulsinpräparat frisch oder gealtert zur Analyse diente. Die enzymatische Wirksamkeit nahm beim Aufbewahren der trockenen Mandelpulver und der Emulsinpräparate ab, die untersuchten Emulsinproben waren in bezug auf den Zeitwert der Amygdalinspaltung von 10, 18 und 41 auf 18, 54 und 93 zurückgegangen. Aber da das Altern wie die Isolierung und Reinigung eine Gelegenheit zur Verschiebung des Zeitwertverhältnisses bietet, so sind die Produkte von verminderter Wirksamkeit nicht weniger geeignet für unsere Schlußfolgerungen wie frische.

Für die Übereinstimmung irgendwelcher Zeitwertverhältnisse haben sich bisher keine Anhaltspunkte ergeben.

Beim Vergleich von bitteren Mandeln und einem Handelspräparat von Emulsin erscheint die Übereinstimmung des Quotienten von β-Methylglucosid- und Amygdalin-

spaltung, auch von Raffinose- zu Amygdalinspaltung bemerkenswert, aber das Verhältnis zwischen Lactose- und Amygdalinspaltung ist hier weit abweichend. Gerade dieses Verhältnis ist bei unseren Emulsinpräparaten ähnlich wie im Ausgangsmaterial, dagegen das Verhältnis von β-Glucosid- zur Amygdalinspaltung schwankend, das Verhältnis Raffinose- zu Amygdalinhydrolyse von dem entsprechenden Zeitwertquotienten der Mandeln weit abweichend.

[196] Das Verhältnis der Lactase zur Prunase ist veränderlich, nämlich 577 bei Aprikosenkernen, 3740 in einem Handelspräparat von Emulsin, das Verhältnis zwischen β-Methylglucosidase und Prunase ist gleichfalls veränderlich, 1110 in einem, 277 in einem zweiten von unseren Emulsinpräparaten. Zwischen Lactase und Prunase, zwischen β-Glucosidase und Prunase besteht also kein Zusammenhang. Die von C. Neuberg [1] im Emulsin entdeckte Raffinase hat zu den Amygdalin spaltenden Enzymen, überhaupt zu den anderen Enzymen des Emulsins keine Beziehung, denn der Quotient aus Raffinosespaltung und anderen Spaltungen differiert stark, das Verhältnis zwischen Raffinose- und Amygdalinhydrolyse wurde bei bitteren Mandeln = 1220, bei süßen = 342 gefunden.

Auch aus den Zeitwertverhältnissen zwischen Prunasin- und Amygdalinspaltung sind noch keine einfachen Schlußfolgerungen zu ziehen. Das Substrat Prunasin entsteht durch Amygdalasewirkung; die Prunase hängt daher in der Erlangung ihres Substrates vom Umsatz der Amygdalase ab. Für die Wirkung der Prunase sind die günstigsten Bedingungen der Gesamtamygdalinspaltung nicht optimal. Der Quotient Prunasin- zu Amygdalinspaltung stimmt in drei von uns dargestellten Emulsinpräparaten (0,6, 0,7, 0,6) nahezu überein, aber der abweichende Quotient 0,93 bei einem käuflichen Emulsin zeigt, daß auch zwischen diesen Zeitwerten kein festes Verhältnis besteht. Für jedes Emulsin mit einem Quotienten, der von 0,6 bis 0,7 abweicht, sollte das optimale p_H besonders bestimmt werden; da dies nicht geschehen ist, sind hier die Zeitwerte für Amygdalinspaltung und die daraus abgeleiteten Quotienten erheblich ungenau.

Es bleibt zu untersuchen, wieweit für die Spaltung der miteinander näher verwandten Phenolglucoside wie Salicin, Helicin, Coniferin, Arbutin u. a. die Zeitwertverhältnisse verschieden sind, und es wird sich daraus ergeben, wie weitgehend die Spezifität der glucosidspaltenden Enzyme der Pflanzensamen ist.

Bei allen bis jetzt untersuchten Emulsinreaktionen handelt es sich um Wirkungen von Enzymen, die voneinander unabhängig und in veränderlichen Verhältnissen gemengt auftreten.

[197] Bestimmungen zur Tabelle 12.

Für die Analyse dienten die Pulver von Mandeln, die wie zur Emulsindarstellung vollkommen entölt und getrocknet waren.

1. Amygdalinspaltung. Bittere Mandeln, ältere Probe. 10 mg während 41 Minuten, Perm. 0,154 n, 6,0 ccm, Spaltung 43,32%, entspr. Zeitwert 528.

Bittere Mandeln, frische Probe. 10 mg in 30 Minuten, Perm. 4,45 ccm, Spaltung 35,1%, entspr. Zeitwert 500.

[1] Biochem. Zs. Bd. 3, S. 519 [1907].

Süße Mandeln, 1 Jahr alt. 10 mg in 40 Minuten, Perm. 0,154 n, 3,0 ccm, Spaltung 20,6%, entspr. Zeitwert 1237 (gegen 500 in frischem Zustand).

Aprikosenkerne. 10 mg in 30 Minuten, Perm. 0,157 n, 2,3 ccm, Spaltung 16%. — 10 mg in 65 Minuten, Perm. 4,5 ccm, Spaltung 32%. — Zeitwerte 1200 und 1250.

2. Prunasinspaltung. Aprikosenkerne. 10 mg in 60 Minuten, Perm. 0,154 n, 3,0 ccm. — Spaltung 41,23%, entspr. Zeitwert 766.

3. β-Methylglucosidspaltung. Bittere Mandeln, ältere Probe. 250 mg in 1380 Minuten, Perm. 0,154 n, 7,0 ccm, Spaltung 49,75%, entspr. Zeitwert 345000.

Bittere Mandeln. Frische Probe. 250 mg in 1440 Minuten, Perm. 7,3 ccm, Spaltung 52%, entspr. Zeitwert 339000.

Süße Mandeln. 1 Jahr alt. 250 mg in 1020 Minuten, Perm. 5,7 ccm, Spaltung 40,1%, entspr. Zeitwert 332000.

4. Lactosespaltung. Bittere Mandeln, frische Probe. 125 mg in 1380 Minuten, Perm. 0,154 n, 9,0 ccm, Spaltung 14%, entspr. Zeitwert 860000.

Aprikosenkerne. 125 mg in 1770 Minuten, Perm. 0,154 n, 9,5 ccm, Spaltung 28%, entspr. Zeitwert 442000.

5. Raffinosespaltung. Bittere Mandeln, ältere Probe. 250 mg in 1290 Minuten, Perm. 3,8 ccm, Spaltung 27,9%, entspr. Zeitwert 645000.

Bittere Mandeln. Frische Probe. 250 mg in 1440 Minuten, Perm. 0,154 n, 4,4 ccm, Spaltung 32,4%, entspr. Zeitwert 610000.

Süße Mandeln, 1 Jahr alt. 250 mg in 1020 Minuten, Perm. 0,154 n, 4,5 ccm, Spaltung 33,1%, entspr. Zeitwert 423000.

Aprikosenkerne. 125 mg in 1770 Minuten, Perm. 5,2 ccm, Spaltung 38,5%, entspr. Zeitwert 308000.

Bestimmungen zur Tabelle 13.

1. Amygdalinspaltung. Präparat Nr. 1; 0,8 mg in 30 Minuten, Perm. 0,154 n, 8,15 ccm, Spaltung 58,5%, entspr. Zeitwert 18.

Präp. Nr. 2. 1,0 mg in 31 Minuten, Perm. 4,8 ccm, Spaltung 33,6%, entspr. Zeitwert 54.

Präp. Nr. 3. 1,0 mg in 40 Minuten, Perm. 3,8 ccm, Spaltung 26,3%, entspr. Zeitwert 93.

Handelspräp. 4,0 mg in 30 Minuten, Perm. 0,154 n, 6,4 ccm, Spaltung 45,3%, entspr. Zeitwert 140.

[198] 2. Prunasinspaltung. Präp. Nr. 1. 1,0 mg in 24 Minuten, Perm. 0,154 n., 5,5 ccm, Spaltung 77,4%, entspr. Zeitwert 11.

Präp. Nr. 2. 2,0 mg in 21 Minuten, Perm. 3,8 ccm, Spaltung 52,6%, entspr. Zeitwert 30.

Präp. Nr. 3. 2,0 mg in 38 Minuten, Perm. 4,4 ccm, Spaltung 61,2%, entspr. Zeitwert 56.

Handelspräp. 4,0 mg in 30 Minuten, Perm. 3,4 ccm, Spaltung 47%, entspr. Zeitwert 130.

3. β-Methylglucosidspaltung. Präp. Nr. 1. 4,0 mg in 2340 Minuten, Perm. 5,7 ccm, Spaltung 40,1%, entspr Zeitwert 12200

Präp. Nr. 2 40 mg in 360 Minuten, Perm. 8,4 ccm, Spaltung 60,4%, entspr. Zeitwert 10800.

Präp. Nr. 3 20 mg in 300 Minuten, Perm. 2,25 ccm, Spaltung 15,7%, entspr. Zeitwert 22600.

Handelspräp. 200 mg in 900 Minuten, Perm. 10,2 ccm, Spaltung 74,6%, entspr. Zeitwert 90000.

4. Lactosespaltung. Präp. Nr. 1. 36 mg in 1500 Minuten, Perm. 0,154 n, 11,28 ccm, Spaltung 77%, entspr. Zeitwert 26400.

Präp. Nr. 2. 100 mg in 1440 Minuten, Perm. 11,2 ccm, Spaltung 75%, entspr. Zeitwert 75000.

Präp. Nr. 3. 100 mg in 960 Minuten, Perm. 10,1 ccm, Spaltung 44%, entspr. Zeitwert 111000.

Handelspräp. 300 mg in 360 Minuten, Perm. 9,1 ccm, Spaltung 15%, entspr. Zeitwert 486000.

5. Raffinosespaltung. Präp. Nr. 1. 20 mg in 2700 Minuten, Perm. 3,1 ccm, Spaltung 22,6%, entspr. Zeitwert 140000.

Präp. Nr. 3. 200 mg in 390 Minuten, Perm. 0,154 n, 4,2 ccm, Spaltung 30,9%, entspr. Zeitwert 142000.

Handelspräp. 200 mg in 1380 Minuten, Perm. 8,9 ccm, Spaltung 68%, entspr. Zeitwert 170000.

Tabelle 12. Enzymatische Analyse verschiedener Mandeln.

Nr.	Zeitwert für	Bittere Mandeln		Süße Mandeln	Aprikosenkerne
		Ältere Probe (5 Mon.)	Frische Probe		
1	Amygdalinspaltung. . . .	528	500	1240	1200, 1250
2	Prunasinspaltung		—	—	770
3	β-Methylglucosidspaltung .	345000	339000	332000	—
4	Lactosespaltung	—	860000	—	442000
5	Raffinosespaltung	645000	610000	423000	308000

[199] Tabelle 13. Verschiedene Wirkungen von Emulsinpräparaten.

Nr.	Zeitwert für	Präp. Nr. 1. Zeitw. f. Amygdalin frisch 10; 6 Mon. alt	Präp. Nr. 2. Zeitw. f. Amygdalin frisch 18; 5 Mon. alt	Präp. Nr. 3. Zeitw. f. Amygdalin frisch 41; 7 Mon. alt	Handelspräparat
1	Amygdalinspaltung . . .	18	54	93	140
2	Prunasinspaltung	11	39	56	130
3	β-Methylglucosidspaltung.	12200	10800	22600	90000
4	Lactosespaltung	26400	75000	111000	486000
5	Raffinosespaltung	140000	—	142000	170000

Tabelle 14. Zeitwertquotienten verschiedener Mandeln.

Nr.	Quotient	Bittere Mandeln		Süße Mandeln	Aprikosenkerne
		Ältere Probe	Frische Probe		
1	β-Glucosidspaltung: Amygdalinspaltung	653	680	268	—
2	Lactosespaltung: Amygdalinspaltung	—	1720	—	360
3	Raffinosespaltung: Amygdalinspaltung	1220	1220	342	250
4	Prunasinspaltung: Amygdalinspaltung	—	—	—	0,62
5	Lactosespaltung: β-Glucosidspaltung	—	2,5	—	—
6	Raffinosespaltung: Lactosespaltung	—	0,7	—	0,7
7	Lactosespaltung: Prunasinspaltung		—	—	577

[200] Tabelle 15. Zeitwertquotienten verschiedener Emulsinpräparate.

Nr.	Quotient	Präp. Nr. 1	Präp. Nr. 2	Präp. Nr. 3	Handelspräparat
1	β-Glucosidspaltung: Amygdalinspaltung	680	200	243	643
2	Lactosespaltung: Amygdalinspaltung	1470	1390	1200	3480
3	Raffinosespaltung: Amygdalinspaltung	7800	—	1530	1230
4	Prunasinspaltung: Amygdalinspaltung	0,6	0,7	0,6	0,9
5	Lactosespaltung: β-Glucosidspaltung	2,2	7	4,9	5,4
6	Raffinosespaltung: Lactosespaltung	5,3		1,3	0,35
7	Lactosespaltung: Prunasinspaltung	2400	1920	1980	3740
8	β-Glucosidspaltung: Prunasinspaltung	1110	277	404	692

Zeitschrift für physiologische Chemie **121**, S. 183 [1922].

78. ZUR KENNTNIS DES EMULSINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und GERTRUD OPPENHEIMER.

(Zweite Abhandlung.)

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. Mai 1922.)

In ihrer vor kurzem veröffentlichten Arbeit untersuchten R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI[1] emulsinhaltige Samen und Emulsinpräparate in der Absicht, durch quantitative Bestimmung verschiedener Zucker- und Glucosidspaltungen zu prüfen, ob für jeden einzelnen Fall der Hydrolyse ein spezifisches Enzym existiert. Besitzt eine Komponente des Emulsin genannten Enzymgemisches die Fähigkeit, mehrere Substrate zu spalten, so wird sich nach der in einigen Untersuchungen[2] über Hefeenzyme eingeführten Methode der Zeitwertquotienten ein konstantes Verhältnis dafür ergeben bei verschiedenen pflanzlichen Ausgangsstoffen, ferner beim Vergleich von frischem Pflanzenmaterial mit gealtertem oder mit den daraus gewonnenen Präparaten. Die Bestimmung der Zeitwerte für die Wirkungen von Emulsin auf Amygdalin, Prunasin, Lactose, Raffinose und β-Methylglucosid haben keine Anhaltspunkte für die Übereinstimmung irgendwelcher Zeitwertquotienten ergeben. Es scheint sich also bei den in der ersten Abhandlung untersuchten Emulsinreaktionen um Wirkungen von Enzymen [184] zu handeln, die voneinander unabhängig und in veränderlichen Verhältnissen gemischt auftreten.

Im folgenden wird zur Prüfung der Enzymspezifität die quantitative Analyse der emulsinhaltigen Samen und zwar von Prunus amygdalus und domestica auf einige β-Phenolglucoside ausgedehnt, nämlich auf Phenylglucosid selbst, Salicin, Helicin und Arbutin. Dabei hat sich in 8 Proben von emulsinhaltigen Samen und Emulsinpräparaten genaue Konstanz der Zeitwertquotienten für die Hydrolyse von

[1] Diese Zs. Bd. 117, S. 172 [1921].

[2] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 199 [1921], R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921].

Phenylglucosid, Salicin und Helicin ergeben. Wenn man die Zeitwerte auf Helicin, das am schnellsten gespalten wird, bezieht, kommt zwar durch das Fallen der nach dem Gesetz der monomolekularen Reaktion berechneten Konstante der Helicinspaltung eine kleine Ungenauigkeit in diese Quotienten, aber sie stimmen doch in allen Fällen innerhalb der Fehlergrenzen überein. Es hat sich also kein Anhaltspunkt dafür finden lassen, daß es verschiedene Enzyme sind, die auf diese drei aromatischen Glucoside, die Derivate des Phenols selbst, des Salicylalkohols und Salicylaldehyds wirken.

Dadurch wird zum ersten Mal durch quantitative Beobachtung für ein zuckerspaltendes Enzym wahrscheinlich gemacht, daß es verschiedene Substrate anzugreifen vermag. Für eine solche Schlußfolgerung erscheint das experimentelle Material, wie es die Tab. 4 zusammenstellt, noch knapp; es ist daher beabsichtigt, den Vergleich dieser Zeitwerte auf einen viel größeren Bereich auszudehnen, um die Folgerung nachzuprüfen.

Es ist der Methode eigentümlich, daß sie, so lange nicht sehr ausgedehntes analytisches Material vorliegt, nur endgültige Ergebnisse liefert, wenn stark differierende Zeitwertverhältnisse zutage treten. Viele derartige Angaben, aus denen sich auf Spezifität der Arbutinase, Amygdalase, Prunase wie früher der Galaktoraffinase und der Emulsinlactase schließen läßt, werden im folgenden mitgeteilt. Besonders bemerkenswert ist das Ergebnis, daß β-Methyl- und β-Phenylglucosidase nichts miteinander gemein zu haben scheinen. Die Quotienten ihrer Zeitwerte sind nämlich entschieden und weit differierend, z. B. beträgt der [185] Quotient Zeitwert für Methylglucosidspaltung: Zeitwert für Phenylglucosidspaltung bei einer Probe von bitteren Mandeln 6,2, bei einer anderen 9,5 und bei Zwetschgenkernen 56. Die untersuchten Kerne von Prunus domestica waren nämlich außerordentlich arm an β-Methylglucosidase, etwa 6mal ärmer als die damit verglichenen bitteren Mandeln.

β-Phenylglucosidase, Helicinase und Salicinase sind als identisch anzusprechen, die erste dieser Bezeichnungen genügt daher. Ehe ein derartiger Fall bekannt war, hatten R. WILLSTÄTTER und R. KUHN[1] sowie R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI[2] angenommen: „da die Enzyme in so hohem Maße spezifische Reagenzien für den Abbau von Polyosen und Glucosiden sind, so ist es wahrscheinlich, daß gleichen hydrolytischen Wirkungen auch ähnliche oder vergleichbare Konzentrationen von Enzymen entsprechen." Dies war ausgesprochen für verschiedene Enzyme, die auf vergleichbare Substrate wirken. Es zeigt sich jetzt, daß nicht dasselbe gilt für ein Enzym, das verschiedene Substrate spaltet. Es ist in sehr ungleichem Maße für diese Spaltungen geeignet. Die Phenylglucosidase erscheint viel mehr spezifisch für Helicin als für Phenylglucosid, denn die 50proz. Spaltung des letzteren erfordert 50mal mehr Zeit. Der Gedanke, daß die Enzyme in hohem Maße spezifische Reagenzien für den Abbau ihrer Substrate seien, erleidet hierdurch eine gewisse Einschränkung.

[1] a. a. O. S. 185. [2] a. a. O. S. 194.

Bestimmungsmethoden.

Als Maße für die Wirkungen des Emulsins bestimmten WILLSTÄTTER und CSÁNYI die Zeiten, die 1 mg Emulsinpräparat oder emulsinhaltige Pflanzensubstanz braucht, um aus 0,1000 g wasserhaltigem Amygdalin in 20 ccm bei 30° und optimalem p_H die Hälfte der theoretischen Monosemenge abzuspalten. Von den meisten anderen Substraten wurden diejenigen Mengen der Zeitwertbestimmung zugrunde gelegt, die gleich viel Monose liefern, also die äquimolekulare Menge Lactose und die doppeltmolekulare Menge Raffinose oder [186] β-Methylglucosid. Nur von Prunasin war wegen Materialmangels die äquimolekulare Menge eingesetzt, obwohl sie nur halb soviel Glucose liefert.

In der vorliegenden Arbeit trafen wir nur in bezug auf die Substratkonzentrationen für die Zeitwerte zwei Änderungen. Es erschien uns richtiger, für den Vergleich der enzymatischen Wirkungen, der hier allein beabsichtigt war, durchwegs mit äquimolekularen Mengen der Substrate die 50proz. Spaltung anzugeben. Und um die Genauigkeit der Bestimmung bei den Monoglucosiden zu erhöhen, war es dann zweckmäßig, die Amygdalinmenge in 20 ccm zu verdoppeln.

Die Lösungen der Substrate enthielten also in 20 ccm:

0,2000 g Amygdalin (mit 3 H_2O), Mol.-Gew. 511,3
0,1155 g Prunasin, Mol.-Gew. 295,1
0,0794 g β-Methylglucosid (mit ½ H_2O), Mol.-Gew. 203,1
0,1164 g Helicin (mit ¾ H_2O), Mol.-Gew. 297,6
0,1119 g Salicin, Mol.-Gew. 286,1
0,1002 g β-Phenylglucosid, Mol.-Gew. 256,1
0,1064 g Arbutin, Mol.-Gew. 272,1.

Die Hydrolyse dieser Glucoside bestimmten wir, genauer als es polarimetrisch möglich wäre, nach der Reduktionsmethode, und zwar nach BERTRAND, und entfernten wie früher die aus den Glucosiden Prunasin und Amygdalin abgespaltene Blausäure durch Destillation mit Wasserdampf.

Da das bei der Spaltung des Arbutins entstehende Hydrochinon Fehlingsche Lösung auch selbst reduziert, war für die Verhältnisse der enzymatischen Spaltung eine Tabelle (S. 5) der Kupferwerte von Glucose + Hydrochinon zu ermitteln. Dazu stellten wir die für die verschiedenen Spaltungsgrade berechneten Gemische von Arbutin, Hydrochinon und Glucose her aus einer 0,532proz. Arbutinlösung einerseits und der Lösung von 0,2151 g Hydrochinon + 0,3521 g Glucose andererseits.

Ebenso muß auch beim Helicin, obwohl sein Spaltprodukt Salicylaldehyd nicht oder nur spurenweise reduzierend wirkt, eine Tabelle für die Kupferwerte bei verschiedenen Spaltungsgraden aufgestellt werden, da das Helicin Fehlingsche Lösung beim Kochen reduziert, wodurch unter unseren Bedingungen eine Spaltung von über 13% vorgetäuscht wird. Die [187] erforderlichen Gemische stellten wir her aus einer 0,582proz. Lösung von Helicin und einer solchen von 0,2508% Salicylaldehyd- und 0,3521% Glucosegehalt.

Tabelle 1.
Kupferzahlen des Gemisches von Glucose + Hydrochinon neben Arbutin.

Spaltung %	Arbutinlösung ccm	Lösung von Glucose + Hydrochinon ccm	Kupfer mg 1.	Kupfer mg 2.	Mittelwert
0	10	0	—	—	—
10	9	1	13,6	13,1	13,35
20	8	2	26,7	26,7	26,70
30	7	3	40,9	40,9	40,90
40	6	4	55,5	55,0	55,25
50	5	5	66,1	65,5	65,80
60	4	6	81,7	82,2	81,95
70	3	7	95,3	94,8	95,05
80	2	8	109,6	109,4	109,50

Tabelle 2.
Kupferzahlen des Gemisches von Glucose + Salicylaldehyd neben Helicin.

Spaltung %	Helicinlösung ccm	Lösung von Glucose + Salicylaldehyd ccm	Kupfer mg 1.	Kupfer mg 2.	Mittelwert
0	20	0	19,2	19,4	19,3
10	18	2	30,9	31,4	31,2
20	16	4	41,7	42,0	41,9
30	14	6	52,6	53,9	53,3
40	12	8	64,7	65,3	65,0
50	10	10	75,9	76,5	76,2
60	8	12	86,4	88,0	87,2
70	6	14	97,0	97,9	97,5
80	4	16	106,1	107,2	106,6
90	2	18	122,1	119,2	120,6
100	0	20	131,4	130,0	130,7

Wegen der größeren Reduktionswirkung dient bei der Spaltung des Arbutins nur die in 10 ccm enthaltene Menge zur Analyse oder es werden 0,1330 g Arbutin im
[188] 25 ccm-Meßkolben mit Enzym und 2 bis 5 ccm-Puffer angesetzt. Man unterbricht die Spaltung durch Entnahme von 10 ccm des Gemisches und Eintragen in 20 ccm alkalische Seignettesalzlösung und bringt die Flüssigkeit mit 10 ccm Wasser auf die für die Kupfermethode vorgeschriebene Verdünnung. Ebenso wurde das Reaktionsprodukt aus 0,2 g Amygdalin geteilt, indem wir 10 ccm entnahmen und in einen Rundkolben mit 2 ccm 10proz. Schwefelsäure einfließen ließen. Nach dem Entfernen der Blausäure mit Wasserdampf brachte man das Volumen auf 20 ccm.

Die Spaltung der anderen Glucoside bestimmen wir mit je 10 ccm 1,164proz. Lösung von Helicin, 1,119proz. von Salicin, 1,002proz. von Phenylglucosid und 0,7945proz. von Methylglucosid, die man im 250 ccm-Rundkolben mit 2 bis 5 ccm Puffer und so viel Wasser versetzte, daß das Volumen zusammen mit der Emulsinlösung 20 ccm betrug. Das Abstoppen geschah durch Zufügen der alkalischen Seignettesalzlösung.

Optimale Acidität.

Die günstigste Wasserstoffzahl wurde in allen Fällen mit Acetatgemischen nach L. MICHAELIS eingestellt.

Für die Spaltung von SALICIN ist die geeignete Acidität, $p_H = 4{,}4$, schon von E. VULQUIN[1] bestimmt und von uns bestätigt gefunden worden, wie auch B. HELFERICH[2] die Analyse bei $p_H = 4{,}7$ ausführt.

p_H	mg Cu	% Spaltung
4,0	83,1	61,3
4,4	84,2	62,2
4,7	83,7	61,7

Für die Hydrolyse von β-Methylglucosid und von Prunasin haben WILLSTÄTTER und CSÁNYI $p_H = 4{,}4$, von Amygdalin = 6,0 als Optimum bestimmt. Noch unbekannt war die günstige Acidität für die Helicin-, Arbutin- und Phenylglucosidspaltung.

Helicin. Aus Versuchen von 15 Minuten Dauer mit [189] Emulsin (1,6 mg) der bitteren Mandeln ergab sich das Optimum von $p_H = 5{,}3$.

p_H	mg Cu	% Spaltung
4,7	65,3	40,0
5,0	66,8	41,1
5,3	71,6	45,5
5,6	65,5	40,1
5,9	64,5	39,3

Arbutin. Vorversuche zeigten, daß das Optimum zwischen $p_H = 4$ und 5 liegt. In dem engeren Bereich von $p_H = 3{,}8$ bis 4,4 wurden 3 Versuche mit je 4 mg Präparat in 530 Minuten Einwirkungsdauer gemacht. Optimum: $p_H = 4{,}1$.

p_H	mg Cu	% Spaltung
3,8	43,3	31,7
4,1	43,9	32,1
4,4	41,2	30,2

β-Phenylglucosid. In dem Bereich $p_H = 4$ bis 5,3 sind die Unterschiede der Phenylglucosidspaltung sehr klein. 20 mg Präparat spalten in 45 Minuten 31,7 bis 32,4%, bei $p_H = 6$ werden 23,9% gespalten. Als geeigneter Wasserstoffexponent wird 5 gewählt.

Zur Kinetik der Emulsinwirkungen.

Nach WILLSTÄTTER und CSÁNYI folgen die Wirkungen des Emulsins auf Raffinose und Lactose, ferner auf β-Methylglucosid dem Gesetz der monomolekularen Reaktion. Für die Hydrolyse des Salicins ist der nämliche Verlauf von C. S. HUDSON und H. S. PAINE[1]) sowie vor kurzem von B. HELFERICH[2]) beobachtet worden. Dasselbe Gesetz beherrscht auch die Spaltungen von Arbutin und β-Phenylglucosid (Tab. 3), deren Optima etwa zwischen 4 und 5 liegen. Hier bestätigt sich die in der ersten Abhandlung ausgesprochene Erfahrung, daß diejenigen Enzymwirkungen des Emulsins, die in ausgesprochen saurem Gebiet optimal verlaufen, sich dem monomolekularen Gesetz fügen. [190] Auf Helicin ist diese Regel nicht anwendbar. Der Abfall des Wertes $\frac{1}{t}\lg\frac{a}{a-x}$ deutet auf eine Hemmung durch den abgespaltenen Salicylaldehyd

[1] Soc. Biol. Bd. 70, S. 270, 763 [1911].
[2] Diese Zs. Bd. 117, S. 159 [1921].
[1]) J. Am. Soc. Bd. 31, S. 1242 [1909].
[2]) A. a. O., S. 162.

Tabelle 3.
Zeitlicher Verlauf der Salicin-, Arbutin-, Phenylglucosid- und Helicinspaltung.

Substrat	Zeit Min.	Cu mg	Spaltung %	$\frac{10^4}{t} \lg \frac{a}{a-x}$
Salicin	20	27,2	19,2	462,9
	35	43,4	30,9	458,4
	55	62,5	45,3	476,3
	76	78,4	57,6	490,3
	100	91,7	68,0	494,8
Arbutin. . . .	40	39,8	29,2	374,9
	65	56,5	41,9	362,6
	95	76,6	57,0	385,8
	125	88,7	64,8	362,6
	175	101,9	77,6	371,0
Phenylglucosid	45	27,7	19,5	209,3
	135	64,3	46,8	203,0
	180	81,7	60,0	221,0
	225	93,6	69,6	225,3
Helicin	5	28,0	7,0	27,3
	12	35,8	13,6	23,0
	22	42,0	18,5	17,5
	36	54,9	29,2	18,1
	56	68,1	40,3	17,4
	80	80,7	51,0	16,8
	120	94,7	63,2	15,7
	200	111,9	79,7	15,0

hin. Die Helicinhydrolyse wurde daher mit der aus den Bestimmungen der Tab. 3 abgeleiteten empirischen Kurve berechnet, die Spaltungen der anderen Glucoside (außer Amygdalin) mit der logarithmischen Kurve, auch die von Prunasin.

[191] Zeitwerte der Emulsinwirkungen.

Die vergleichende Untersuchung, deren Ergebnisse in der nachfolgenden Tab. 4 zusammengestellt sind, erstreckte sich auf drei verschiedene Pflanzensamen, nämlich mehrere Darstellungen der entölten Pulver von bitteren und süßen Mandeln und von Zwetschgenkernen (Prunus domestica), ferner auf Emulsin selbst, auf käufliches und auf einige nach dem Verfahren der ersten Arbeit dargestellte Präparate aus bitteren und aus süßen Mandeln, und zwar Rohprodukte und aus wäßriger Lösung mit Alkohol umgeschiedene Präparate.

Von den geprüften Wirkungen des Emulsins auf einfache Glucoside erweist sich die auf Helicin, die R. Piria[1] zuerst beobachtet hat, als weitaus die stärkste. Die 50proz. Hydrolyse dieses Substrats durch einen der Pflanzensamen oder ein Emulsinpräparat erfordert $^1/_6$ der Zeit wie die Salicinspaltung, $^1/_{50}$ der Zeit wie die Phenylglucosidspaltung und in einem der Beispiele etwa $^1/_{500}$ der Zeit wie die Methylglucosidhydrolyse.

Nächst der β-Methylglucosidase ist die Arbutinase am schwächsten in den als Emulsin bezeichneten Enzymgemischen vertreten. Die Wirkungen auf die beiden

[1] Liebigs Ann. der Chem. Bd. 56, S. 35 [1845], und zwar S. 67.

Glucoside des Benzaldehydcyanhydrins ergeben ähnliche Zeitwerte wie die Helicinspaltung. Es kam vor, nämlich bei Zwetschgenkernen, daß die 50proz. Spaltung von Amygdalin und von Helicin etwa die gleiche Zeit beanspruchte, während von käuflichem Emulsin das Helicin doppelt so rasch als das Amygdalin gespalten wurde. Die Prunasinhydrolyse erforderte durchschnittlich die doppelte Zeit wie die des Helicins

Quotienten der Emulsinwirkungen.

Die Zeitwerte der verschiedenen Glucosidspaltungen beziehen wir auf den günstigsten Wert, den der Helicinspaltung. Der Quotient Salicinspaltung : Helicinspaltung betrug bei den 4 untersuchten Samen und den 4 Emulsinpräparaten ungefähr 5,5, die Schwankungen von 5,1 bis 5,9 liegen innerhalb der Fehlergrenzen. Ebenso konstant ist in allen Fällen das Verhältnis β-Phenylglucosid-:Helicinspaltung gefunden worden. Es [192] bewegte sich zwischen 48 und 52 und gab etwa den Durchschnitt 50. Die Reihe dieser Quotienten in der Tab. 5 liefert also kein Anzeichen dafür, daß

Tabelle 4.
Glucosidasen-Zeitwerte von Pflanzensamen und Emulsinpräparaten.

Nr.	Emulsinhaltiges Material	mg	Substrat	Versuchsdauer Min.	Cu mg	Spaltung %	Zeitwert
1	Bittere Mandeln, entölt. Pulver, Darst. 1	10	Helicin	31	61,1	34,3	535
		25	Salicin	75	50,7	34,9	3025
		50	Phenylgl.	328	48,2	35,5	26700
		64	Arbutin	409	48,6	35,5	41000
		50	Methylgl.	1340	24,4	17,1	254000
		20	Prunasin	27	49,2	35,2	856
		20	Amygdalin	28	70,0	51,1	475
2	Bittere Mandeln, entölt. Pulver, Darst. 2	10	Helicin	47	69,7	41,4	625
		25	Salicin	80	49,7	34,1	3300
		50	Phenylgl.	425	53,1	38,1	30400
		80	Arbutin	1055	76,5	56,5	69000
		100	Methylgl.	1765	65,3	47,5	189000
		20	Amygdalin	40	66,7	48,5	840
3	Süße Mandeln, entölt. Pulver	50	Helicin	10	72,5	43,3	630
		40	Salicin	78	64,0	44,6	3650
		50	Phenylgl.	254	33,8	23,9	32000
		80	Arbutin	1005	70,0	52,6	74400
		100	Methylgl.	1369	50,4	36,1	210000
		50	Prunasin	15	72,5	53,0	685
		40	Amygdalin	19	69,0	50,4	750
4	Zwetschgenkerne, entölt. Pulver	20	Helicin	12	60,6	34,0	420
		20	Salicin	80	54,1	37,3	2350
		20	Phenylgl.	1320	75,3	55,2	22000
		40	Arbutin	1320	44,9	32,8	92000
		100	Methylgl.	1515	12,9	9,0	1230000
		50	Prunasin	12	72,7	53,2	544
		24	Amygdalin	15	69,2	50,5	357

[193] Tabelle 4. (Fortsetzung.)

Nr.	Emulsinhaltiges Material	mg	Substrat	Versuchsdauer Min.	Cu mg	Spaltung %	Zeitwert
5	Emulsin, Rohprodukt aus Nr. 1	1,6	Helicin	17	72,5	43,3	34,2
		4	Salicin	68	85,9	61,0	200
		20	Phenylgl.	58	53,6	38,6	1640
		32	Arbutin	53	42,7	31,9	3130
		1,6	Prunasin	29	57,6	41,5	60
		1,9	Amygdalin	18	66,5	48,4	36,5
6	Emulsin, ungef. Präp. aus Nr. 2	1,6	Helicin	11	74,8	45,7	20,1
		4	Salicin	32	75,0	52,8	117
		20	Phenylgl.	60	74,5	54,5	1040
		16	Arbutin	165	64,1	48,4	2750
		20	Methylgl.	385	55,4	40,1	10300
		0,8	Prunasin	30	49,6	35,6	37,6
		2,56	Amygdalin	15	82,4	60,6	25,6
7	Emulsin, Lösg. v. Nr. 6 nach 3 Tage Stehen	1,6	Helicin	9	70	41,8	19,0
		4	Salicin	24	63,4	44,0	113
		20	Phenylgl.	50	68,5	49,9	1002
8	Emulsin, ungef. Präp. aus Nr. 3	1,6	Helicin	9	52,1	26,7	34,9
		4	Salicin	35	54,8	37,9	203
		20	Phenylgl.	63	52,6	37,8	1825
		16	Arbutin	119	45,2	33,0	3260
		40	Methylgl.	228	38,2	27,0	19800
		1,6	Prunasin	30	55,5	40,0	64,5
		3,2	Amygdalin	12	61,6	44,7	45,3
9	Emulsin, käufl. Präp. (E. MERCK)	6	Helicin	20	72,7	43,5	150
		40	Salicin	20	69,5	48,7	760
		40	Phenylgl.	180	67,5	49,0	7350
		80	Arbutin	150	50,0	36,3	18300
		50	Methylgl.	1111	44,9	32,0	100000
		19,2	Amygdalin	14	75,8	55,4	220

es sich um verschiedene [194] Komponenten des Emulsingemisches handle, die auf die Substrate β-Phenylglucosid, Salicin und Helicin wirken.

Dies ist die einzige Regelmäßigkeit, durch welche sich die Beschreibung dieses Enzymgemisches vereinfacht. Sonst ergibt der Vergleich der Zeitwertquotienten (Tab. 5) keine Beziehungen, aus denen auf das Wirkungsvermögen eines und desselben Enzyms auf mehrere Substrate geschlossen werden könnte. Das Verhältnis der Arbutinspaltung zur Helicinspaltung ist zwar nicht eben stark schwankend, zwischen 77 und 219, aber die Ausschläge gehen doch weit über die Bestimmungsfehler hinaus. Auch die Hydrolyse von β-Methylglucosid ergab mit der von Helicin in vielen Fällen eindeutige wenn auch nur mäßige Ausschläge der Quotienten, die sich von 333 bis 570, nur bei dem käuflichen Präparat bis 670 bewegten. Aber in den Zwetschgenkernen fand sich ein Beispiel, in dem die Methylglucosidspaltung fast 3000 mal mehr Zeit als die des Helicins erforderte.

An dem Verhältnis der Zeitwerte für die Hydrolyse von Amygdalin und Prunasin, bezogen auf Helicin, oder an den bedeutend divergierenden Quotienten Prunasespaltung: Amygdalinspaltung bestätigt sich, daß Amygdalase und Prunase, wie in der ersten Abhandlung angedeutet worden, in differierenden Verhältnissen auftreten, ohne Zusammenhang miteinander und mit den anderen Emulsinkomponenten.

Tabelle 5.
Zeitwertquotienten der Emulsinwirkungen, bezogen auf Helicin.

Substrat	Bittere Mandeln Nr. 1	Bittere Mandeln Nr. 2	Süße Mandeln Nr. 3	Zwetschgen Nr. 4	Emulsin-Rohprod. Nr. 5	Emulsin, umgef. Präp. Nr. 6	Emulsin, umgef. Präp. Nr. 8	Emulsin, käufl. Präp. Nr. 9
Salicin . . .	5,7	5,3	5,8	5,6	5,8	5,8	5,8	5,1
Phenylglucosid	50	49	50	52	48	52	52	49
Prunasin . . .	1,6	—	1,08	1,30	1,75	1,88	1,85	—
Amygdalin . .	0,89	1,34	1,19	0,85	1,06	1,28	1,30	1,47
Arbutin. . . .	77	110	118	219	90	137	93	122
Methylglucosid	475	302	333	2930	—	512	570	670

Zeitschrift für physiologische Chemie 135, S. 12 [1924].

79. VERZUCKERUNG DER STÄRKE DURCH EMULSIN*.

Von RICHARD KUHN.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. Dezember 1923.)

In salicylsäurehaltigen, wäßrigen Mandelauszügen ist ein stärkespaltendes Ferment von H. WILL[1] vergebens gesucht worden[2]. Die neuere Angabe H. v. EULERS[3], daß in seinem Laboratorium mit Mandelemulsin in keinem Stadium des Stärkeabbaues Bildung von Cellobiose beobachtet werden konnte, geht offenbar auf eine Untersuchung von O. v. FRIEDRICH[4] zurück, dem die Aufspaltung eines bei der Oxalsäurehydrolyse gebildeten Disaccharids („Isomaltose") mit Emulsin gelang. Das Verhalten der Stärke selbst scheint nicht geprüft worden zu sein.

Aus den folgenden Versuchen geht hervor, daß sowohl aus bitteren wie aus süßen Mandeln isolierte Fermentpräparate lösliche Kartoffelstärke weitgehend verzuckern. Das Aciditätsoptimum der Hydrolyse liegt etwa bei $p_H = 5{,}5$. Die Inhaltssubstanz der Stärkekörner, die Amylose, ließ sich durch ein nach der Vorschrift von R. WILLSTÄTTER [13] und W. CSÁNYI[1]) gereinigtes Präparat quantitativ in Malzzucker verwandeln. Ob eine besondere Mandelamylase vorliegt, steht noch nicht fest. Die hier mitgeteilten Beobachtungen sind vielleicht geeignet, die teilweise β-glucosidische Natur der Stärke, auf die nach P. KARRER[2]) die Bildung von Lävoglucosan bei der trockenen Destillation des Polysaccharids[3]) deutet, auf neuem Wege wahrscheinlich zu machen[4]).

* *Vgl. die spätere Arbeit von R. Kuhn „Der Wirkungsmechanismus der Amylasen; ein Beitrag zum Konfigurationsproblem der Stärke", Ann. d. Chem. 443, 1 [1925] und Habilitationsschrift, Universität München, [1925].*

[1] In C. KRAUCH, Landw. Versuchsstation Bd. 23, S. 75; Jahresber. 1878, S. 1035 flg.

[2] Die Anwendung verdünnter Säure ist nach R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI, Diese Zs. Bd. 117, S. 172 [1921], für die Isolierung des Emulsins ungeeignet.

[3] Chemie der Enzyme, II. Teil, 1. Abschn., S. 270 [1922].

[4] Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 5, Nr. 2 [1913]; Chem. Zbl. 1914, I., S. 760.

[1]) A. a. O., und zwar S. 190 flg.

[2]) Helv. chim. acta Bd. III, S. 258 [1920].

[3]) A. PICTET und J. SARASIN, ebenda Bd. 1, S. 87 [1918].

[4]) Für die hydrolytische Spaltung α-glucosidischer Bindungen durch Emulsinpräparate läßt sich nämlich, seitdem die β-Struktur des im Amygdalin enthaltenen Disaccharids erkannt ist (Chem. Ber. Bd. 56, S. 857 [1923]), kein Beispiel mehr anführen.

Experimenteller Teil.

Die Verzuckerung löslicher Stärke (C. A. F. KAHLBAUM) durch ein von derselben Firma bezogenes Emulsin verlief bei $p_H = 4{,}5$ im ersten Drittel des Umsatzes monomolekular.

25 ccm 2proz. Substrat + 1000 mg Emulsin + 5 ccm 1,45 mol. NaH_2PO_4 zu 50 ccm; 30°.

Zeit (Min.)	10 ccm reduzieren n/10-Jod (ccm)	Zunahme des Jodverbr. (ccm)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^7$
0	5,64	0,00	—	—
2760	6,70	1,06	17,2	297
3900	7,70	2,06	32,4	299
∞	—	(6,17)	(100,0)	—

Ein Kontrollversuch ohne Emulsin ergab nach 3000 Minuten keine Zunahme des Reduktionsvermögens. Eine „Salzhydrolyse" der Stärke kommt bei den vorliegenden Versuchen, die unter reichlichem Toluolzusatz ausgeführt wurden, nicht in Frage.

Der zeitliche Verlauf der Hydrolyse durch ein aus süßen [14] Mandeln isoliertes, 160mal wirksameres Präparat, verzögerte sich stark, nachdem ein Viertel der theoretischen Maltosemenge gebildet war.

25 ccm 2proz. lösliche Stärke + 15 ccm „Citrat" ($p_H = 5{,}0$) + 200 mg Ferment[1] zu 50 ccm; 30°.

Zeit (Min.)	5 ccm verbr. n/10-Jodlösung (ccm)	Zunahme des Jodverbr. (ccm)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^5$
0	0,60	—	—	—
60	1,00	0,40	13,0	101
90	1,19	0,59	19,2	102
120	1,35	0,75	24,4	102
181	1,58	0,98	31,8	92
420	2,10	1,50	48,7	69
1380	2,46	1,86	60,4	16

Im Parallelversuch mit gekochter Enzymlösung verbrauchten 5 ccm des Reaktionsgemisches nach 215 Minuten 0,58 ccm, nach 1420 Minuten 0,59 ccm n/10-Jod.

Bei wechselnder Wasserstoffzahl wurden mit dem nämlichen Emulsin in 2 Stunden folgende Reduktionszunahmen gemessen (Mittelwerte für je 2 Proben von 10 ccm):

m/30-Puffer	Citrat	Citrat	Citrat	Citrat	Citrat	Phosphor
p_H	3,8	4,4	5,0	5,6	6,2	6,8
Jodverbrauch . .	0,10	1,88	2,34	2,60	2,50	2,34

Bei Einwirkung eines anderen Enzympräparates (aus bitteren Mandeln) auf Amylose[2] entsprach das nach 2 bis 3 Tagen beobachtete Reduktionsvermögen der Bildung von 98% der Theorie eines Disaccharids.

[1] Präparat Nr. 3 der Tab. 4 von R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER, Diese Zs. Bd. 121, S. 183 [1922], und zwar S. 192f.

[2] Über die Darstellung wird eine demnächst erscheinende Untersuchung über Amylasen berichten.

[15] 20 ccm Amyloselösung (185 mg Trockensubstanz) + 10 ccm $^{m}/_{15}$-Phosphat ($p_H = 5,2$) + 84,6 mg Emulsin[1] zu 50 ccm; 30°.

Zeit (Min.)	10 ccm reduzieren $^{n}/_{10}$-Jod (ccm)	Reduktions-Zunahme	Spaltung (%)
0	0,50	—	
2460	2,65	2,15	94,4
4000	2,74	2,24	98,3
∞	—	(2,28)	(100,0)

Mit gekochter Emulsinlösung war nach 3200 Minuten keine Reduktionszunahme zu erkennen.

Zum Nachweis der Spaltprodukte wurden 150 ccm Amyloselösung (nicht elektrodialysiert; Trockengehalt = 1,32 %) mit 10 ccm Acetatgemisch ($p_H = 5,4$), 200 mg Emulsin und 10 ccm Toluol bei Zimmertemperatur versetzt. Eine nach 20 Stunden entnommene Probe blieb auf Zusatz von Jodlösung farblos. Nach 60 Stunden wurde die Hälfte der klar gewordenen Lösung mit 6 g Natriumacetat aufgekocht, filtriert und mit 4 g Phenylhydrazinchlorhydrat im siedenden Wasserbade erhitzt, wobei keine Ausscheidung von Glucosazon zu beobachten war. Die beim Erkalten ausgeschiedenen citronengelben Nadeln zersetzten sich, nachdem sie zweimal aus Wasser umkrystallisiert worden waren, zwischen 189 und 190°.

101,3 mg des Osazons, in 4 ccm Pyridin + 6 ccm Alkohol gelöst, drehten im 2 dm-Rohr + 1,50°, entsprechend $[\alpha]_D^{18,5} = 74°$ statt 75°.

Die zweite Hälfte wurde, mit Toluol überschichtet, durch Kollodium gegen 200 ccm Wasser dialysiert, dessen Drehung im 4 dm-Rohr (18,5°) + 1,67° (= 0,317 % Maltosehydrat) betrug. Aus dem für 20 ccm bestimmten Jodverbrauch von 3,41 und 3,43 ccm berechnet sich in Übereinstimmung damit der Gehalt zu 0,308 %.

[1] Präparat Nr. 5 der angeführten Tabelle von R. Willstätter und G. Oppenheimer.

Zeitschrift für physiologische Chemie **125**, S. 1 [1923].

80. ÜBER SPEZIFITÄT DER ENZYME.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und RICHARD KUHN.

I. Zur Theorie der Zeitwertquotienten.

Von RICHARD KUHN*.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 1 Abbildung im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 26. Oktober 1922.)

Als relatives Maß für die Menge eines Enzyms gelten die Geschwindigkeiten, mit denen unter gleichen äußeren Bedingungen der chemische Umsatz des Substrates vor sich geht. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird gewöhnlich entweder durch den in gleichen Zeiten bewirkten Umsatz ausgedrückt, wenn man sich auf die Messung der Anfangsstadien der Reaktion beschränkt, wo Umsatz und Zeit einander direkt proportional sind, oder durch Ermittlung der für einen bestimmten Umsatz erforderlichen Zeit, den Zeitwert, wenn der zeitliche Verlauf, die Kinetik der Reaktion, für ein größeres Umsatzgebiet bekannt ist. Die Zeitwertmessung liegt sowohl den präparativ gerichteten Untersuchungen über Enzyme aus dem hiesigen Laboratorium zugrunde, als auch jenen Untersuchungen[1], die aus dem Verhältnis der [2] Umsatzgeschwindigkeiten von 2 Substraten durch Enzymlösungen und -präparate verschiedener Herkunft und verschiedenen Reinheitsgrades über die Spezifität der Enzyme zu entscheiden suchen. Die Zeitwerte wurden auf folgende Weise ermittelt:

Man wählt für die Versuche eine bestimmte Temperatur und Substratkonzentration. Dann bestimmt man die für die Enzymwirkung optimale $[H^{\cdot}]$, indem man ein und dieselbe Enzymmenge bei wechselnder Acidität auf das Substrat einwirken läßt und nachsieht, bei welcher $[H^{\cdot}]$ der Umsatz nach gleichen Zeiten am weitesten fortgeschritten ist. Sodann bestimmt man beim $[H^{\cdot}]$-Optimum die Beziehung zwischen

* *Diese und die folgende Untersuchung hat Herr R. Kuhn als mein Privatassistent ausgeführt (Inauguraldissertation, München, Nov. 1922), in der Zeit, als die in unseren verschiedenen Arbeiten beobachteten Differenzen der Zeitwertquotienten die Erkenntnis vorbereiteten, daß wechselnde Beimischungen von Hemmungskörpern und Aktivatoren die Schwankungen der Quotienten bedingen.*

[1] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 199 [1921]; R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, ebenda Bd. 115, S. 180 [1921]; R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI, ebenda Bd. 117, S. 172 [1921]; R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER, ebenda Bd. 121, S. 183 [1922] (*Abh. 76, 75, 77, 78*).

Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit und ermittelt den zeitlichen Verlauf der Reaktion, um aus den nach irgend welchen Zeiten beobachteten Spaltungsgraden diejenige Zeit berechnen zu können, nach der z. B. 50% des Substrates umgesetzt wären. Die so ermittelten Zeiten stellen die Zeitwerte dar. Die Beziehung

(1) $$\text{Enzymmenge} \times \text{Zeitwert} = c$$

hat sich für viele Enzymreaktionen in weiterem oder engerem Bereiche als gültig erwiesen, wenn es sich um verschiedene Mengen ein und derselben Enzymlösung handelt. Den Schlußfolgerungen, die aus Zeitwertmessungen gezogen wurden, liegt indessen die Annahme zugrunde, daß eine Beziehung nach Art der Gleichung (1) für ein Enzym nicht nur unabhängig von seiner Herkunft und seinem Reinheitsgrade überhaupt gilt, sondern, daß auch der numerische Wert von c immer derselbe ist, daß z. B. gleiche Invertin*mengen* immer die gleiche Inversionsgeschwindigkeit des Rohrzuckers bewirken, mag das Enzym im Hefepilz oder in einem Präparate von 1000 mal höherer enzymatischer Konzentration enthalten sein. Diese Annahme stützt sich auf die Erfahrungstatsache von der Konstanz der Invertinwirkung[1]. Es zeigt sich jedoch bei ihrer eingehenden experimentellen Prüfung in der nachfolgenden Abhandlung, daß die mit dem Invertin im natürlichen Milieu [3] vergesellschafteten Begleitstoffe in gewissen Fällen wohl imstande sind, die Wirksamkeit des Enzyms zu beeinflussen. Diese Beobachtung scheint die in neuerer Zeit namentlich von A. KIESEL[1]) vertretene Auffassung zu bestätigen, daß der quantitative Vergleich verschiedener Objekte und Individuen in bezug auf Fermentgehalt unrichtig wird, „da wir nur auf Grund der fermentativen Wirkung eine Vorstellung über die Quantität des Fermentes bekommen, die Fermentwirkung aber von den Beimengungen höchst beeinflußt wird". Die folgenden Überlegungen gelten der Frage, ob und unter welchen Bedingungen es auch in diesem Falle möglich ist, aus den Wirkungen eines Fermentes auf die Fermentmenge zu schließen.

I. Der Zeitwert als Maß der Enzymmengen.

Den meisten Theorien der Katalyse ist die Vorstellung gemeinsam, daß für die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion, nach K.W. ROSENMUND und F. ZETZSCHE[2]) auch für die Richtung, in der die Reaktion verläuft, die Vereinigung des Katalysators mit den Reaktionsteilnehmern maßgebend ist und daß der analytisch nachweisbare Umsatz durch den Zerfall dieses Komplexes zustande kommt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt demgemäß ab:

1. von der Bildungsgeschwindigkeit,
2. von der Zusammensetzung und Konzentration,
3. von der Zerfallsgeschwindigkeit des Katalysator-Reaktoren-Komplexes.

[1] R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar Kap. D.

[1]) Diese Zs. Bd. 118, S. 284 [1921/22].

[2]) Berichte der deutsch. Chem. Ges. Bd. 54, S. 425 [1921], und zwar S. 427. Diese Ansicht haben indes schon H. E. ARMSTRONG und E. F. ARMSTRONG mit besonderer Rücksicht auf die Enzyme vertreten. Proc. Royal Soc., B, Bd. 86, S. 561 [1913].

Einen zeitlich meßbaren Verlauf der Bindung eines Enzyms an sein Substrat glauben D. D. VAN SLYKE und A. G. CULLEN [3] am System Urease-Harnstoff beobachtet zu haben. Bei anderen Enzymreaktionen ist ein derartiger Effekt noch nicht beschrieben worden. Es scheinen sich namentlich die [4] kohlehydrat- und glucosidspaltenden Enzyme mit ihren Substraten äußerst rasch zu verbinden. Darum wollen wir den Einfluß von Verunreinigungen auf die Bildungsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes vorerst außer Betracht lassen und den Einfluß von Aktivatoren und Hemmungskörpern auf Natur, Konzentration und Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes untersuchen. Es ist das Verdienst von L. MICHAELIS zuerst am Beispiel des Hefeinvertins die Aufklärung der verschiedenartigen Hemmungen einer Fermentreaktion angebahnt zu haben. Während z. B. nach L. MICHAELIS und M. L. MENTEN [1]) die Verlangsamung der Inversionsgeschwindigkeit durch Glucose auf einer Änderung der Konzentration der Saccharase-Saccharose-Verbindung beruht, indem die Hexose einen Teil des freien Enzyms mit Beschlag belegt und dadurch der Vereinigung mit dem Disaccharid entzieht, besteht der hemmende Einfluß von Glycerin nach L. MICHAELIS und H. PECHSTEIN [2]) in der Herabsetzung der Zerfallsgeschwindigkeit der Rohrzucker-Invertin-Verbindung.

In welcher Weise ist es nun denkbar, daß die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion, die durch momentane Vereinigung des Enzyms mit dem Substrat eingeleitet wird und die sich durch den darauffolgenden Zerfall dieses Komplexes zu erkennen gibt, durch einen dritten Körper beeinflußt wird? Wenn einem Enzym die Fähigkeit zukommt, mit Hilfe derselben chemisch wirksamen Gruppen zwei oder mehrere Stoffe anzugreifen: in welchem Verhältnis wird die Umsatzgeschwindigkeit der Substrate beeinflußt werden? Ist es überhaupt möglich, die Frage nach der Spezifität der Enzyme durch Messung von Reaktionsgeschwindigkeiten zu beantworten?

Wir nehmen an, daß in den Lösungen eines Enzyms nur ein Körper K enthalten ist, der die nach dem Schema

(2) $$E + S \rightleftharpoons (ES)\uparrow$$

verlaufende Vereinigung des Enzyms E mit dem Substrat S zum zerfallenden ($\uparrow$) Komplex (ES) und auch den Zerfall des letzteren zu beeinflussen vermag. Der durch $\rightleftharpoons$ angedeutete [5] Vorgang möge ein Adsorptions- oder Dissoziationsgleichgewicht bedeuten. Der Körper K soll imstande sein, nicht nur die aktiven Massen bzw. die aktiven Oberflächen von E, S und (ES) zu verändern, also in quantitativer Hinsicht den Verlauf der Reaktion (2) zu bestimmen, sondern er soll auch qualitativ die Zusammensetzung von E, S und (ES) beeinflussen können. Auch hier möge es sich um Adsorptions- bzw. Dissoziationsgleichgewichte (im Extremfall um feste chemische oder adsorptive Bindung) zwischen K und den Reaktionsteilnehmern handeln. Wir beschränken uns ferner auf Reaktionen, die unter Anwendung so geringer Mengen von Enzymmaterial verfolgt werden können, daß die in wechselndem Verhältnis vor-

[3] Jl. Biol. Chem. Bd. 19, S. 141 [1914].

[1]) Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913]. [2]) Biochem. Zs. Bd. 60, S. 79 [1914].

kommenden anderen Verunreinigungen die Natur des Mediums[1] nicht merklich ändern. Dann wird bei konstanter h[2] und Temperatur die Geschwindigkeit der Reaktion durch die Zusammensetzung (Struktur) und Konzentration des labilen Komplexes gegeben sein.

Trügerisch werden die üblichen Zeitwertmessungen und Quotientenbestimmungen offenbar nur, wenn der Körper K in wechselndem Verhältnis in bezug auf E auftritt. Es kann sich dabei um einen bekannten Stoff handeln, dessen Konzentration in der Enzymlösung analytisch bestimmbar ist, der vielleicht vom Enzym getrennt werden kann, oder um eine noch unerkannte Beimischung, die, aus dem natürlichen Milieu stammend, im Laufe der Reinigungsoperationen abgetrennt wird, oder endlich um einen dem Enzym selbst nahestehenden Körper, der Adsorption und Elution, Fällung und Dialyse mit ihm durchmacht, der aber in verschiedenem Ausgangsmaterial in wechselnder Menge enthalten ist (vgl. die folgende Abhandlung, Kapitel II, Abschnitt 3).

Wir untersuchen, ob es möglich ist, den Körper K zu entdecken und den Mechanismus seiner Wirkung aufzuklären, [6] wenn wir z. B. mit jedem Enzymmaterial, auf dessen Enzymgehalt geschlossen werden soll, die Reaktionsgeschwindigkeit, ihre Abhängigkeit von der h (die Aktivitäts-p_H-Kurve) und der Substratkonzentration (die Aktivitäts-p_S-Kurve) experimentell bestimmen und miteinander vergleichen. Gelingt es so die Art und Weise aufzuklären, nach der K die Reaktionsgeschwindigkeiten ändert, so wollen wir untersuchen, ob die Schwankungen eines Zeitwertquotienten vielleicht im wechselnden Verhältnis von $K:E$ ihren Grund haben.

Als ausschlaggebender Faktor für die Beurteilung der Enzymspezifität hat sich namentlich die wechselnde Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Substratkonzentration erwiesen und wir glauben an dieser Stelle die Wichtigkeit der Aktivitäts-p_S-Kurven betonen zu müssen. Während man sich nämlich seit den grundlegenden Arbeiten von S. P. L. Sörensen und L. Michaelis über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für biologische Vorgänge klar geworden ist, während die Aktivitäts-p_H-Kurven der Enzyme eifrig bearbeitet und allgemein prozentisch gleiche Teile der Reaktionsgeschwindigkeiten verglichen werden (gewöhnlich die Maximalgeschwindigkeiten selbst durch Einstellung des h-Optimums), hat man willkürliche und wechselnde Bruchteile der Enzymmengen durch Vernachlässigung der Aktivitäts-p_S-Kurven miteinander verglichen. Dazu mögen folgende Gründe beigetragen haben:

Die optimale Wasserstoffzahl ist für die Mehrzahl der Enzyme leicht zu ermitteln und dank der Ausbildung der Puffergemische festzuhalten, während die optimale Substratkonzentration oft aus Gründen der Löslichkeit, Enzymzerstörung usw. nicht erreichbar ist. Sie stellt ferner kein ausgesprochenes Maximum dar, sondern ist ein Grenzwert, der sich nur aus Messungen bei anderen Konzentrationen extrapolieren läßt.

[1] Über die Bedeutung der Aktivitätskoeffizienten für die Theorie der Reaktionsgeschwindigkeiten vgl. J. N. Brönsted, Zs. f. physik. Chem. Bd. 102, S. 169 [1922].
[2] h = Wasserstoffionenkonzentration; vgl. L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl., Teil I, S. 10 [1922].

Der Mechanismus der Wasserstoffionenwirkung bei enzymatischen Katalysen ist derzeit noch nicht so weit aufgeklärt, daß man ein allgemeines klares Bild davon gewinnen könnte. Die Gestalt der Geschwindigkeits-p_H-Kurven zu deuten, ist leicht, die Eigenschaften dieser Kurven zu verstehen, ist [7] schwierig. Im folgenden machen wir die Annahme, daß der Parameter dieser Kurven nicht allein durch die Konzentration der labilen Enzym-Substrat-Verbindung gegeben ist, um die Prüfung dieser Annahme an weiterem Versuchsmaterial vorzubereiten. Es hat sich nämlich gezeigt[1], daß im Falle des Invertins die Aktivitäts-p_H-Kurve nicht durch Änderung des aktiven Anteils des Enzyms oder des Rohrzuckers oder durch Dissoziation der Saccharase-Saccharose-Säure erklärt werden kann, daß sie vielmehr von der Natur der Rohrzucker-Invertin-Verbindung bedingt ist, deren Zerfallsgeschwindigkeit von der Acidität bestimmt wird.

Unter den gemachten Annahmen wird K nach einer oder gleichzeitig nach mehreren der nachstehenden Möglichkeiten die Reaktion (2) beschleunigen oder verzögern:

I. Gruppe. *K* reagiert mit dem freien Substrat.

1. K vernichtet die Reaktionsfähigkeit des Substrates.

$$S + K \rightleftharpoons (SK), \qquad S + E \rightleftharpoons (SE)\uparrow. \tag{3}$$

Für den gebundenen Anteil des Substrates gilt $(SK) \leq K$. Beschränken wir uns auf Fälle, in denen $K \ll S$ ist, so kann sich K nicht geltend machen. $S - (SK)$ ist praktisch identisch mit S.

Lassen wir diese Einschränkung fallen, so verdient namentlich die Änderung der Reaktionsfähigkeit des Substrates durch Wasserstoffionen Beachtung, eine Möglichkeit, die H. v. EULER wiederholt betont hat, die auch für nicht enzymatische Katalysen von Wichtigkeit ist. Bei der Wasserstoffsuperoxyd-Platin-Katalyse hat schon G. BREDIG[2] die Salzbildung des Hydroperoxyds zur Erklärung des Einflusses der OH-Ionen auf die Reaktionsgeschwindigkeit herangezogen.

Die Entscheidung darüber, ob z. B. nur die Kationen oder Anionen eines amphoteren Substrates zur Reaktion mit dem Enzym befähigt sind, wird dann erbracht werden können, wenn [8] sich aus der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Acidität und aus den Dissoziationskonstanten des Ampholyten die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Substrates für konstantes p_H berechnen läßt, wo die Konzentration der Anionen und Kationen zur Gesamtkonzentration des Substrates in einem bestimmten Verhältnis steht. Aber auch für die Neutralsalze kommt eine Wechselwirkung mit dem Substrat in Betracht. L. MICHAELIS und H. PECHSTEIN[1]) nehmen z. B. bei der Leberkatalase eine Wechselwirkung der Salze mit den unelektrischen Fermentmolekülen an. Die H_2O_2-Katalyse

[1] Nachstehende Abhandlung, Kapitel II, Abschnitt 4.

[2] G. BREDIG und MÜLLER v. BERNECK, Zs. f. physik. Chem. Bd. 31, S. 258 [1899].

[1]) Biochem. Zs. Bd. 53, S. 320 [1913].

verläuft am schnellsten in möglichst verdünnten Elektrolytlösungen. (ES) ist labil, alle Salze (K) wirken hemmend. Es ist gut denkbar, daß dieser Effekt auf der Stabilisierung des H_2O_2 beruht, die außer durch Säuren und viele organische Stoffe auch durch Elektrolyte gelingt. Es steht zu erwarten, daß die Untersuchung derartiger Erscheinungen uns bei manchem Substrat über die Natur der Partialaffinitäten, durch deren Betätigung sich die Komplexe mit den Katalysatoren bilden, Aufschluß bringen wird.

Die Verschiebung der Aktivitäts-p_H-Kurve der Katalase bei steigendem Neutralsalzgehalt könnte dann verschiedene Ursachen haben: Entweder werden die eben besprochenen Affinitätsbeträge vom Elektrolyten abgesättigt, das Hydroperoxyd im Sinne von (3) in eine nicht mehr reaktionsfähige Stufe übergeführt, und die Wasserstoffionen sind an einem Dissoziationsgleichgewicht der labilen H_2O_2-Katalaseverbindung beteiligt, derart etwa, wie es L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN[2] bei der Saccharase-Saccharose-Säure annehmen, oder

2. Das Enzym reagiert mit dem gebundenen Substrat.

$$(4) \qquad S + K \rightleftharpoons (SK), \quad E + S \rightleftharpoons (ES)\uparrow \quad \text{und} \quad E + (SK) \rightleftharpoons (ESK)\uparrow .$$

In diesem Fall werden mit steigendem Salzgehalt neben den (ES)-Teilchen immer mehr (ESK)-Teilchen gebildet werden, deren Zerfallsgeschwindigkeit von der Aktivität der Wasserstoffionen in anderer Weise abhängt oder deren [9] Säuredissoziationskonstante verschieden ist. Im allgemeinen wird K in dem nach (4) verlaufenden Prozeß sowohl aktivieren als hemmen können.

Kehren wir daher zur Betrachtung natürlicher Verunreinigungen zurück, so kann hier offenbar der Fall eintreten, von dem A. KIESEL[1] sagt: Es „können die anwesenden fremdartigen Körper der Tätigkeit des Ferments einer zum Angriff dargebotenen Substanz gegenüber hinderlich, einer anderen gegenüber aber ohne Einfluß oder sogar behilflich sein". Unter unserer Voraussetzung $K \ll S$ kann durch wechselnde Mengen des Hemmungskörpers K der Zeitwert der Reaktion (4) nicht geändert werden. Dies wird jedoch in hervorragendem Maße eintreten, wenn K als Aktivator fungiert. Dazu betrachten wir den Extremfall

$$(5) \qquad S + K \rightleftharpoons (SK), \quad (SK) + E \rightleftharpoons (ESK)\uparrow ,$$

wobei (ES) entweder gar nicht gebildet wird oder stabil ist.

Als Beispiel untersuchen wir, ob die Speicheldiastase, deren Wirksamkeit an die Gegenwart von Chlornatrium oder von anderen Salzen gebunden ist, hierher gehören kann. Für wechselnde Mengen von NaCl müßte die Abhängigkeit vom p_H die gleiche sein, wenn wir mit dem Salzzusatz nicht so weit gehen, daß er sich wie bei Elektrolyten und Farbstoffindicatoren schon durch Änderung der Dissoziationskonstante (der Wasserstoffionenaktivität) bemerkbar macht. Für verschiedene

[2] Biochem. Zs. Bd. 110, S. 217 [1920].
[1] a. a. O.

$K(K_1, K_2, \ldots)$ also für verschiedene Neutralsalze wären dagegen die Parameter der Aktivitäts-p_H-Kurven verschieden, entsprechend der verschiedenen Natur der labilen Verbindungen (ESK_1), (ESK_2), ..., wie es L. MICHAELIS und H. PECHSTEIN[2] bei der Speicheldiastase tatsächlich beobachtet haben. Die durch eine bestimmte Enzymmenge bewirkten Umsatzgeschwindigkeiten müssen in hohem Maße vom Quotienten $K:E$ abhängen. Immerhin wäre es nicht schwierig, relative Mengen von Diastase zu bestimmen, da wir das Kochsalz durch Dialyse entfernen und nachher dosieren können. [10] Wir müßten nur in bezug auf die Stärke prozentisch gleiche Kochsalzmengen anwenden, um gleiche Aktivierungen zu erhalten. E. STARKENSTEIN[1]) hat jedoch gezeigt, daß die zur Aktivierung nötigen Salzmengen den angewandten Diastasemengen proportional sind. Für die an Amylasen beobachteten Aktivierungserscheinungen kommt also eine verschiedene Reaktionsfähigkeit von Cl-, NO_3-, usw. Stärke höchstens in untergeordnetem Maße in Betracht.

Ist der Aktivator K in (5) unbekannt und nicht abtrennbar, so wird man durch Zusatz überschüssigen Kochsaftes u. dgl. oder durch anderweite künstliche Aktivierung des Substrates, wenn diese nur genügend groß ist, die zur Messung des Enzymgehalts nötigen vergleichbaren Bedingungen herstellen können. Trifft auch das nicht zu, handelt es sich vielmehr um einen dem Enzym selbst nahestehenden empfindlichen Körper, so ist es nicht möglich, aus kinetischen Messungen Schlußfolgerungen auf die Konzentration von E zu ziehen, wenn das Verhältnis $K:E$ schwankt. Trotzdem ist es möglich, über die Spezifität dieses Ferments gegenüber zwei Substraten zu entscheiden. Denn die durch verschiedene K-Mengen aktivierten Beträge der Substrate S_1 und S_2 werden immer in demselben Verhältnis stehen und darum wird auch das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten von $K:E$ unabhängig sein. Wenn sich — als Grenzfall von (5) — die Aktivierung nur auf eines der Substrate bezieht, so wird offenbar die Frage nach der spezifischen Natur von E bedeutungslos. Liegt dieser Grenzfall im Schema (4) vor (Beispiel KIESEL), so ist die Kenntnis der in verschiedenen Enzymlösungen vorhandenen Mengen K nötig, um den E-Gehalt bestimmen und über die Spezifität des Enzyms entscheiden zu können.

Für die hier besprochenen Möglichkeiten der „Substrataktivierung" fehlt es an genügend untersuchten Beispielen. Die bei weitem überwiegende Mehrzahl von Aktivatoren und Hemmungskörpern verschafft sich durch Wechselwirkung mit dem Enzym Geltung.

[11] II. Gruppe. *K* reagiert mit dem freien Enzym.

1. K bindet das Enzym zu einer unwirksamen Stufe.

$$E + K \rightleftharpoons \underset{\text{I}}{(EK)}, \quad E + S \rightleftharpoons \underset{\text{II}}{(ES)}\uparrow. \tag{6}$$

K ist ein Hemmungskörper, der einen Teil des aktiven Enzyms der Vereinigung mit dem Substrat entzieht. Die Abhängigkeit der Enzymwirkung vom p_H wird unberührt

[2] Biochem. Zs. Bd. 59, S. 77 [1914].

[1]) Biochem. Zs. Bd. 24, S. 210 [1910] und Bd. 47, S. 300 [1912].

bleiben, wenn durch die Wasserstoffionen nicht der labile Anteil, sondern die Labilität von (ES) bestimmt wird. Ein richtiges Bild von der Konzentration des Enzyms läßt sich durch Extrapolation der Zeitwerte für unendliche hohe Substratkonzentration erhalten. Die Gleichgewichte I und II sind dann so weit verschoben, daß sich K nicht mehr geltend machen kann, obwohl die Parameter der Aktivitäts-p_S-Kurven bei wechselndem $K:E$ differieren. Für den Fall eines Dissoziationsgleichgewichts beobachtet man anstatt der Konstanten K- des Gleichgewichts II die scheinbare Dissoziationskonstante $K_S\left(\frac{K}{K_K}+1\right)$, wenn K_S die Konzentration des Körpers K, K_K die Konstante des Gleichgewichts I bedeutet. Die Affinität zu einem zweiten Substrat S wird ganz entsprechend von $\frac{1}{K_S}$ auf $\frac{1}{K_S\left(\frac{K}{K_K}+1\right)}$ erniedrigt werden. Mit Rücksicht auf die in der folgenden Abhandlung beschriebenen Beobachtungen über den Einfluß natürlicher Begleitstoffe auf die Aktivität der Hefesaccharase wird dieser Fall im nächsten Kapitel noch ausführlicher behandelt.

2. Das Substrat reagiert mit dem gebundenen Enzym.

$$E + K \rightleftharpoons (EK), \qquad (EK) + S \rightleftharpoons (EKS)^{*}, \tag{7}$$

(ES) wird nicht gebildet oder ist stabil. Hierher gehören zahlreiche Fermente vorwiegend tierischer Herkunft, für deren Wirksamkeit die Gegenwart gewisser Kationen oder Anionen nötig ist. Am Beispiel der Diastase haben wir schon im zweiten Absatz der I. Gruppe über die Beziehung der Reaktionsgeschwindigkeit zum Enzymgehalt in diesem Fall gesprochen. Auch über die Spezifität des Enzyms läßt sich unter den im letzten Absatz (II, 1) angeführten Gesichtspunkten [12] entscheiden. Hier erhebt sich die Frage: Soll man die Systeme (EK_1), (EK_2) usw. als besondere Enzyme bezeichnen oder genügt es zu verlangen, daß unter gleichen äußeren Bedingungen die Affinität eines Enzyms, sein Wirkungsvermögen, dasselbe sei?

Wir halten es für richtig, jedes derartige System in reaktionskinetischem Sinne als selbständiges Enzym zu behandeln, also z. B. von Chloriddiastase, Nitratdiastase usw. zu sprechen, wie es in der Literatur[1] bereits üblich ist. In präparativem Sinne haben wir es aber in Anbetracht der Reproduzierbarkeit der Aktivatorwirkung und der gleichmäßigen Ausführung der Analysen mit einem Enzym zu tun. Diese straffe Fassung des reaktionskinetischen Enzymbegriffs wird auch dann von Nutzen sein, wenn neben dem gebundenen Enzym auch das freie wirksam ist.

$$E + K \rightleftharpoons (EK),\ E + S \rightleftharpoons (ES)^{*} \quad \text{und} \quad (EK) + S \rightleftharpoons (EKS)^{*}. \tag{8}$$

K kann je nachdem aktivieren oder hemmen. Die Bestimmung der Pankreaslipase[2] bietet Beispiele dafür, wie weitgehend sich das variable Verhältnis zwischen Enzymgehalt und Geschwindigkeit der Fettspaltung durch künstliche Aktivierung

[1] L. MICHAELIS und H. PECHSTEIN, a. a. O.; H. v. EULER, Chemie der Enzyme, I, S. 35.
[2] R. WILLSTÄTTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ und F. MEMMEN, Diese Zs. (im Druck) (*Abh. 88*).

oder Hemmung ausgleichen läßt. Unter solchen Bedingungen wird auch das Verhältnis der Spaltungsgeschwindigkeiten verschiedener Fette von $K:E$ und von der Natur von K unabhängig sein, wovon der Mechanismus der K-Wirkung mit dem der zugesetzten Aktivatoren übereinstimmt. Sehr häufig wird bei einer mikroheterogenen Reaktion Aktivierung und Hemmung auf rein physikalischen Änderungen des Milieus an der Oberfläche der Kolloidteilchen beruhen, ohne daß diese Körper auf die Konfiguration der wirklichen Enzymgruppen von Einfluß wären. Wenn daher z. B. die Lipase in verschiedenen Vorkommnissen mit wechselnden Mengen von Körpern assoziiert ist, die mit ihren wirksamen Gruppen in Wechselwirkung stehen, dann gestattet eine gleichartige „physikalische" Aktivierung, auch wenn dadurch ein hohes Vielfaches der natürlichen Reaktionsgeschwindigkeit erzielt [13] wird, nicht, die Enzymmengen zu vergleichen und über die Spezifität des Fermentes zu entscheiden. Die Erfahrungen, von denen die folgende Mitteilung berichtet, machen es wahrscheinlich, daß solche Begleiter dem Enzym selbst nahe stehen, und sie zeigen den Weg, auf dem ihr Vorhandensein erkannt und trotz ihrer Gegenwart die analytische Bestimmung relativer Enzymmengen möglich ist.

III. Gruppe. K reagiert mit dem Enzym-Substrat-Komplex.

1. Durch den Hemmungskörper K wird die zerfallende Enzymsubstratverbindung in eine stabile Form übergeführt.

$$E + S \rightleftharpoons (ES)\uparrow, \qquad (ES)\uparrow + K \rightleftharpoons (ESK). \tag{9}$$

2. (ESK) ist labil.

$$E + S \rightleftharpoons (ES), \qquad (ES) + K \rightleftharpoons (ESK)\uparrow. \tag{10}$$

K ist Aktivator. Wenn auch (KS) zerfällt,

$$E + S \rightleftharpoons (ES)\uparrow \quad \text{und} \quad (ES)\uparrow + K \rightleftharpoons (ESK)\uparrow, \tag{11}$$

kann K sowohl hemmen als auch aktivieren. Diese Mechanismen dürften sich neben den in der I. und II. Gruppe diskutierten in der Regel nur in beschränktem Maße geltend machen.

Zusammenfassend heben wir hervor: Für die Reaktionsbeeinflussung enzymatischer Vorgänge gibt es einige typische Möglichkeiten, zwischen denen sich durch kinetische Messungen prinzipiell entscheiden läßt. Solange wir auf die Fermente nur aus ihren Wirkungen schließen können, muß es das Ziel sein, den Einfluß der natürlichen Fermentbegleiter zunächst in einfachen Fällen auf diese Typen zurückzuführen. Dann erst sind wir imstande, aus der Messung von Reaktionsgeschwindigkeiten ein exaktes Maß für die Enzymmengen abzuleiten und die spezifische Natur dieser Katalysatoren zu enthüllen.

II. Der Zeitwertquotient als Funktion der Substratkonzentration.

Enzymbindende Verunreinigungen machen sich bei der Ermittlung von Zeitwertquotienten dadurch geltend, daß der wirksame Anteil des Enzyms geändert wird und zwar verschieden stark, wenn die Affinität zu den Substraten verschieden [14] ist.

Das Ergebnis der Messungen muß dann das gleiche sein, als ob wir mit derselben Enzymlösung das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten das eine Mal z. B. in 0,2n-, das andere Mal in 0,3n-Lösung bestimmt und miteinander verglichen hätten. Darum wollen wir jetzt die Abhängigkeit des Quotienten von der Substratkonzentration betrachten, unter der Annahme, daß die Vereinigung der Enzyme mit den Substraten durch das Massenwirkungsgesetz geregelt wird. Diese Annahme bedeutet einen Grenzfall[1] für eine mikroheterogene Katalyse, womit wir es ja bei den Enzymreaktionen zu tun haben. Aber die Erfahrung lehrt, daß dieser Grenzfall durchaus nicht selten ist. Hat sich doch bei Versuchen über die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration gezeigt, daß nicht nur die Rohrzuckerspaltung[2], die Hydrolyse von α-Methylglucosid durch Hefeauszüge[3], oder die von β-Glucosiden durch Emulsin[4], sondern sogar die Trypsinverdauung der Gelatine[5] vom Massenwirkungsgesetz beherrscht wird, wenn man die Annahme macht, daß die Umsatzgeschwindigkeit der Konzentration der vorhandenen Enzymsubstratverbindung proportional sei. Auf solche Systeme beziehen sich die folgenden Entwicklungen. Man möge dabei an zwei von einander völlig unabhängige Enzyme denken, auch wenn wir mit Rücksicht auf die späteren Anwendungen folgende Bezeichnungen einführen:

$[S]$ sei die Konzentration der Saccharose in freiem Zustand (praktisch übereinstimmend mit der Gesamtkonzentration des Rohrzuckers),

Σ die gesamte molare Konzentration der Saccharase und

[15] σ die molare Konzentration des an Saccharose gebundenen Anteils des Enzyms, also auch gleich der Konzentration der Enzymsubstratverbindung.

Unter $[R]$, P und ϱ möge man analog die Raffinosekonzentration sowie die Konzentration der gesamten und gebundenen (aktiven) Raffinase verstehen.

Dann besagt das Massenwirkungsgesetz:

$$(12)\qquad \frac{[S](\Sigma - \sigma)}{\sigma} = K_S \quad \text{und} \quad \frac{[R](P - \varrho)}{\varrho} = K_R,$$

woraus für die Konzentration der Saccharase-Saccharose-Verbindung und des Raffinase-Raffinose-Komplexes folgt:

$$(13)\qquad \sigma = \Sigma \cdot \frac{[S]}{[S] + K_S} \quad \text{und} \quad \varrho = P \cdot \frac{[R]}{[R] + K_R}.$$

$\frac{\sigma}{\Sigma}$ als Funktion von $\log \frac{1}{[S]}$ und $\frac{\varrho}{P}$ als Funktion von $\log \frac{1}{[R]}$ stellen Dissoziationsrestkurven dar, deren Wendepunkte durch $-\log K_S$ und $-\log K_R$ festgelegt sind.

[1] Über die Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes vgl. die treffenden Ausführungen von L. MICHAELIS, Biochem. Zs. Bd. 115, S. 269 [1921] und Koll. Zs. Bd. 31, S. 246 [1922], und zwar S. 251.

[2] L. MICHAELIS und M. L. MENTEN, Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913]; H. v. EULER und J. LAURIN, Diese Zs. Bd. 110, S. 55 [1920] und die nachstehende Abhandlung.

[3] P. RONA und L. MICHAELIS, Biochem. Zs. Bd. 58, S. 148 [1914].

[4] Nach unveröffentlichten Versuchen mit Frl. Dr. J. GRASER.

[5] J. H. NORTHROP (mitbearbeitet von F. JOHNSTON), Journ. Gen. Physiol. Bd. 4, S. 487 [1922].

Die Proportionalitätsfaktoren zwischen σ und ϱ und den experimentell bestimmbaren Anfangsgeschwindigkeiten der Rohrzucker- und Raffinosehydrolyse v_S und v_R werden im allgemeinen ungleich sein:

$$(14) \qquad v_S = C_S \cdot \frac{\sigma}{\Sigma}, \qquad v_R = C_R \cdot \frac{\varrho}{P}.$$

$C_S : C_R$ bedeutet dann das Verhältnis der Hydrolysengeschwindigkeiten des Di- und Trisaccharids, die durch ein und dieselbe Enzymmenge hervorgerufen werden, wenn jede Reaktion bei einer solchen Konzentration des Substrates gemessen wird, daß der an Zucker gebundene molare Anteil beider Enzyme in jedem Fall prozentisch gleich ist. Das wird im allgemeinen nur bei $[S] \neq [R]$ eintreten. Die Zeitwertquotienten werden aber immer in äquimolaren Lösungen der Substrate bestimmt. Darum stellt erst der für unendlich große Substratkonzentration extrapolierte Quotient der Anfangsgeschwindigkeiten das Verhältnis der Proportionalitätsfaktoren $C_S : C_R$ dar.

$$(15) \qquad \lim_{[S] = [R] \to \infty} Q = C_S : C_R = Q_\infty .$$

[16] Aus (13) und (14) ergibt sich für den Quotienten bei beliebiger Substratkonzentration

$$Q_S = \frac{v_S}{v_R} = \frac{C_S}{C_R} \cdot \frac{\sigma \cdot P}{\Sigma \cdot \varrho} = \frac{C_S}{C_R} \cdot \frac{[S] \cdot ([R] + K_R)}{[R] \cdot ([S] + K_S)},$$

was wir in Anbetracht von $[S] = [R]$ mit Berücksichtigung von (15) auch schreiben können

$$(16) \qquad Q_S = Q_\infty \cdot \frac{[S] + K_R}{[S] + K_S}.$$

Wählen wir $\log \frac{1}{[S]}$ als unabhängige Variable x, dann stellt Q_S als Funktion von x eine Dissoziations- bzw. Dissoziationsrestkurve mit folgenden Eigenschaften dar:

$$(17) \qquad Q_S = Q_\infty \cdot \frac{e^{-x \ln 10} + K_R}{e^{-x \ln 10} + K_S},$$

$$(18) \qquad \frac{dQ_S}{dx} = Q_\infty \cdot \ln 10 \cdot \frac{K_R e^{-x \ln 10} - K_S e^{-x \ln 10}}{(e^{-x \ln 10} + K_S)^2},$$

$$(19) \qquad \frac{d^2 Q_S}{dx^2} = Q_\infty \cdot (\ln 10)^2 e^{-x \ln 10} \cdot \frac{(K_S - K_R)(K_S^2 - e^{-2x \ln 10})}{(e^{-x \ln 10} + K_S)^4}.$$

Aus (16) folgt

$$(20) \qquad \lim_{[S] = 0} Q_S = Q_0 = Q_\infty \cdot \frac{K_R}{K_S}.$$

Es läßt sich zeigen, daß (15) und (20) Asymptoten von (16) sind. Für die Abszisse des Wendepunktes der Quotientenkurve (17) ergibt sich aus (19) unter der Bedingung $K_S \neq K_R$

$$(21) \qquad K_Q = K_S,$$

während für die Ordinate Q_M aus (17), (20) und (21)

$$(22) \qquad Q_M = Q_\infty \frac{K_S + K_R}{2 K_S} = \frac{1}{2} (Q_0 + Q_\infty)$$

folgt. Für die Wendetangente ist die Neigung

(23) $$\operatorname{tg}\alpha = \frac{Q_\infty}{4}\cdot\ln 10\left(\frac{K_R}{K_S} - 1\right) = 0{,}575\,(Q_0 - Q_\infty)$$

charakteristisch, wie sich aus (18) mit Berücksichtigung von (20) und (21) ergibt. [17] Der Wendepunkt der Quotientenkurve ist also in jedem Fall dadurch ausgezeichnet, daß seine Abszisse mit dem Parameter derjenigen Enzymwirkung zusammenfällt, der die kleinste Dissoziationskonstante der Enzymsubstratverbindung zukommt. Greift dieses Enzym noch andere Substrate an, so soll die Hydrolyse desjenigen, zu dem es die größte Affinität besitzt, als Hauptwirkung des Enzyms von seinen Nebenwirkungen unterschieden werden, unabhängig von der Geschwindigkeit, mit der die Komplexe des Enzyms mit den verschiedenen Substraten zerfallen. Die Ordinate des Wendepunktes stellt immer das arithmetische Mittel der für unendlich kleine und unendlich große Substratkonzentration extrapolierten Geschwindigkeitsquotienten dar und ist daher im Gegensatz zur Abszisse durch den numerischen Wert der Nebenaffinitäten bedingt.

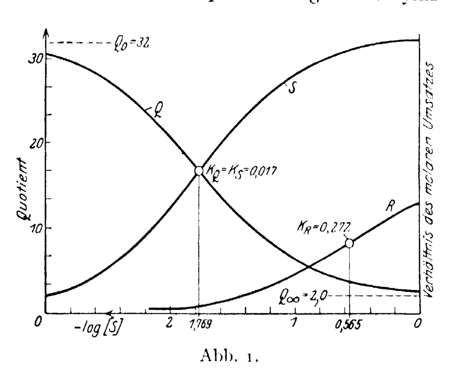


Abb. 1.

Abb. 1 zeigt die Lage der Quotientenkurve Q, die sich aus den Dissoziationsrestkurven S und R ergibt. Der Parameter der Hauptwirkung S beträgt 0,017, derjenige der Nebenwirkung R 0,272. Q_∞ hat den Wert 2,0. Die Ordinaten der Q-Kurve sind im Verhältnis 1:0,03 verkleinert gegenüber denjenigen [18] der S-Kurve, die ihrerseits im Vergleich mit dem Maßstabe der Abszisse im Verhältnis 2:1 vergrößert sind. Aus (20) folgt für die obere Asymptote der Q-Kurve $Q_0 = 32$. Durch die Wahl des Maßstabes ist erreicht, daß die Wendepunkte der S- und Q-Kurve nicht nur gleiche Abszisse, sondern auch gleiche Ordinate haben, da die Asymptoten von Q zum Wendepunkt von S sehr angenähert symmetrisch liegen. Setzt man noch $Q_0 - Q_\infty$ und den Maximalwert der S-Kurve gleich der Einheit der Abszisse, so schneiden sich die Wendetangenten von Q und S unter einem Winkel von 120°.

In besonderen Fällen kann die Quotientenkurve folgende Eigenschaften besitzen:

1.) $$K_S = K_R, \qquad Q_\infty = 1.$$

Die Dissoziationsrestkurven fallen zusammen. Die Q-Kurve ist eine zur x-Achse parallele Gerade im Abstand 1.

2.) $$K_S = K_R, \qquad Q_\infty \gtrless 1.$$

Die Dissoziationsrestkurven sind affin. $Q_0 = Q_M = Q_\infty = Q$. Die Q-Kurve ist eine zur x-Achse parallele Gerade im Abstand Q.

3.) $$K_S \gtrless K_R, \qquad Q_\infty = 1.$$

Die Dissoziationsrestkurven können durch Parallelverschiebung längs der Abszissenachse zur Deckung gebracht werden.

$$Q_0 = K_R : K_S, \qquad Q_M = \frac{K_R + K_S}{2 K_S}.$$

Der für $[S] = 0$ extrapolierte Geschwindigkeitsquotient stellt das Verhältnis der Dissoziationskonstanten dar.

4.) $$K_S < K_R, \qquad Q_\infty \gtrless 1$$

ist der oben behandelte allgemeine Fall. Ist $K_S > K_R$, so übernimmt K_R die Bedeutung des Hauptparameters.

Ist die Abhängigkeit der Hauptwirkung von der Substratkonzentration bekannt, so genügt wegen der ausgezeichneten Lage der Q-Kurve eine einzige Quotientenbestimmung, um das arithmetische Mittel aller denkbaren Quotienten zu finden, die für die betreffende Enzymlösung von den verdünntesten [19] bis zu den konzentriertesten Lösungen der Substrate möglich sind. Diese Quotientenbestimmung hat bei derjenigen Normalität der Substrate zu erfolgen, die für die Hälfte der maximalen Hauptwirkung charakteristisch ist. Das gilt allgemein für den Vergleich beliebiger Enzymwirkungen, z. B. für das Verhältnis der Geschwindigkeiten, mit denen ein Hefeauszug Rohrzucker und α-Methylglucosid spaltet. Wie weit sich der Quotient von diesem Mittelwert entfernen kann, wissen wir zunächst nicht. Wir wissen nur, daß er beim Übergang zu konzentrierteren Lösungen immer kleiner werden muß, um in verdünnteren ganz entsprechend zu wachsen. Je nachdem aber Fußpunkt, Mittelstück oder Scheitel der Dissoziationsrestkurven, die der Enzymwirkung mit der niedrigeren Affinität entsprechen, in das experimentell günstigste Gebiet fallen, wird es möglich sein, nach einer der folgenden Methoden den Gesamtverlauf der Q-Kurve mit größerer oder geringerer Genauigkeit aufzufinden:

1. Man bestimmt die einzelnen Parameter K_S und K_R. Dann genügt die genaue Kenntnis eines Quotienten bei beliebiger Konzentration, um das Verhältnis der Ordinaten der beiden Kurven festzustellen. Die Q-Kurve läßt sich durch Einsetzen von K_S, K_R und Q_∞ in (16) berechnen bzw. konstruieren.

2. Bei hochmolekularen und schwer löslichen Substraten, zu denen das Enzym nur geringe Affinität besitzt, wird nur der Fußpunkt der Dissoziationsrestkurve untersucht werden können. Ist Q_M bestimmbar und läßt sich der Quotient für unendlich kleine $[S]$ extrapolieren, so läßt sich die Q-Kurve konstruieren, da ihr Wendepunkt und eine Asymptote bekannt sind. Die zweite Asymptote muß zum Wendepunkt symmetrisch liegen. Oder man verfährt nach

3., indem man einige in der Nähe von Q_M gelegene Quotienten bestimmt und aus der so ermittelten Lage der Wendetangente nach (22) und (23) Q_0 und Q_∞ berechnet, woraus sich auch K_R ergibt.

4. Ist weder das Gebiet von K_R, noch das von K_S mit dem Substrat R erreichbar, so gelangt man bei Kenntnis von K_S [20] durch Kombination von je zwei (nicht zu nahe aneinanderliegenden) Quotienten auf folgendem Wege zum Ziel: Bei der Substratkonzentration S_a sei der Quotient Q_a, bei S_b Q_b bestimmt worden. Die Q-Kurve (Q als Funktion von S) ist dann:

$$Q = \frac{Q_a (S_a + K_S)(S - S_b) - Q_b (S_b + K_S)(S - S_a)}{(S_a + S_b)(S + K_S)} . \tag{24}$$

III. Der Zeitwertquotient als Maß der Enzymspezifität.

1. Artverschiedenheit der Fermente.

Nach den Ausführungen des I. Kapitels beruht die Bedeutung der Affinitätsmessung für die Quotientenmethode darauf, daß nicht nur in bezug auf die Wasserstoffionen-, sondern auch in bezug auf die Substratkonzentration gleiche Bruchteile der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten verglichen werden. Ob jedoch in verschiedenen Enzymlösungen gleichen Maximalgeschwindigkeiten auch gleiche Enzymmengen zugrunde liegen, läßt sich durch Affinitätsmessungen nicht entscheiden. Im II. Kapitel (Abschn. 4) der folgenden Mitteilung wird gezeigt, daß z. B. durch Wasserstoffionen nicht der aktive Anteil des Rohrzuckers, der Saccharase oder der Rohrzucker-Saccharaseverbindung, sondern vielmehr die Labilität der letzteren Verbindung bestimmt zu werden scheint. Es ist nämlich die Abhängigkeit des Gleichgewichts zwischen Enzym und Zucker von der h jedenfalls viel zu gering, als daß man durch Änderung desselben die Aktivitäts-h-Kurve des Invertins erklären könnte. Darum haben wir auch in den Enzymlösungen mit natürlichen Begleitern zu rechnen, die die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzymsubstratverbindung, nicht aber ihre Konzentration zu ändern vermögen.

In solchen Fällen wird die Quotientenbestimmung durch Kontrollversuche zu ergänzen sein, die unter wechselseitigem Zusatz des eigenen und fremder Kochsäfte, Dialysate, Extrakte usf. anzustellen sind. Die Methode der arteigenen und artfremden Kochsäfte (vgl. Kap. II, Abschn. 6 und Kap. III, Abschn. 5 der nachstehenden Abhandlung) wird aber auch umgekehrt für die [21] Frage nach der Natur der enzymbindenden Verunreinigungen von Bedeutung sein.

Es wird mit ihrer Hilfe gelingen, auf indirektem Wege über die Artspezifität der Fermente zu entscheiden, also die Frage zu lösen, ob die wirksamen Gruppen derjenigen Katalysatoren, deren sich verschiedene Hefepilze oder Phanerogame und Kryptogame oder Pflanze und Tier z. B. für die Rohrzuckerhydrolyse bedienen, identisch sind oder nicht. Denn einer gewissen Konfiguration der chemisch aktiven Gruppen im Enzymmolekül entspricht zweifellos eine ganz bestimmte Affinität zum Substrat, und wir können untersuchen, ob die Affinitätsverschiedenheiten, ob Unterschiede der Kinetik und der Aktivitäts-p_H-Kurven, ob ein verschiedener Einfluß von Aktivatoren, Hemmungskörpern u. dgl. bloß durch Art und Menge der in jedem Falle vorhandenen Begleiter zu erklären sind. Um den Sinn dieser Methode, zu deren voll-

kommener Beherrschung noch Untersuchungen über Reversibilität und Reihenfolgephänomene ausstehen, zu erläutern, verweisen wir auf die in der folgenden Mitteilung (Kap. II, Abschn. 6) nachgewiesene Identität der in verschiedenen Heferassen enthaltenen Invertine von differierender Rohrzuckeraffinität.

Vielfach hat man Schlüsse über die Artverschiedenheit von Fermenten aus anderen Beobachtungen zu ziehen versucht. E. FISCHER und W. NIEBEL[1] deuteten z. B. die Tatsache, daß durch den Dünndarm des Hundes und des Pferdes Rohrzucker, nicht aber Raffinose gespalten wird, während die Hefe und ihre Auszüge sowohl das Di-, als auch das Trisaccharid zu hydrolysieren vermögen, durch die Annahme, daß das rohrzuckerspaltende Enzym des Dünndarms mit dem Invertin der Hefe nicht identisch sei. Auch die Beobachtung, daß das Serum von Pferde- und Rinderblut den Malzzucker leicht spaltet, ohne α-Methylglucosid zu verändern, während Maltose und α-Methylglucosid gegenüber den Enzymen der Hefe „völlige Übereinstimmung" zeigen, führte E. FISCHER zu [22] der Ansicht[1]), „daß ein und dasselbe Enzym der Hefe, die Maltase, sowohl die α-Methylglucoside, als auch die Melibiose und verschiedene als Dextrine bezeichnete, kompliziertere Kohlehydrate angreifen kann. Die Erfahrung, daß einzelne Hefen nur die Maltose, aber nicht die Melibiose spalten, oder daß es Maltasen gibt, wie z. B. im Blut der Säugetiere, welche die α-Glucoside unberührt lassen, ist kein triftiger Grund dagegen."

Wie R. WILLSTÄTTER und R. KUHN[2]) hervorheben, genügt es aber nach den mit der Methode der Zeitwertquotienten gewonnenen Erfahrungen nicht, „mit E. FISCHER in verschiedenen Organismen verschiedene Invertine und verschiedene Maltasen anzunehmen, auch mit dem Vorkommen verschiedener Hefeinvertine und verschiedener Raffinasen in Hefen müßte man rechnen." R. WILLSTÄTTER und seine Mitarbeiter haben sich jedoch in ihren S. 1 zitierten Untersuchungen nicht für die Annahme einer überaus weitgehenden Artspezifität der Enzyme entschieden. Die Befunde ließen sich gut mit der Vorstellung erklären, „daß Maltose und α-Methylglucosid auch von der Hefe mittels zweier verschiedener Enzyme hydrolysiert werden." Auch für die Verschiedenheit von tierischem und pflanzlichem Invertin „entfällt die Stütze, wenn sich die Hydrolyse von Rohrzucker und Raffinose auf verschiedene Enzyme zurückführen läßt." Gelingt es andererseits, die Rohrzucker- und Raffinosespaltung auf dasselbe Hefeenzym zurückzuführen, so ist damit auch die Verschiedenheit derjenigen Saccharasen erwiesen, die ohne Wirkung auf das Trisaccharid sind.

An dieser Stelle muß jedoch hervorgehoben werden, daß die niedrige Affinität verschiedener Invertine teilweise wenigstens durch Assoziation der Enzymteilchen mit gewissen Körpern derart zustande kommt, daß dadurch die Diffusion des Zuckers an die reaktionsfähigen Stellen des Katalysators herabgesetzt wird, und es wäre denkbar, daß schließlich nur noch das Substrat mit dem kleinsten Molekulargewicht bzw.

[1] Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wissensch. 1896, S. 73; Untersuchungen über Kohlehydrate und Fermente, S. 868, und zwar S. 875 [1909].

[1]) Diese Zs. Bd. 26, S. 60, und zwar S. 80 [1898].

[2]) Diese Zs. Bd. 115, S. 180, und zwar S. 181 [1921] (*Abh.* 75).

Molekularvolumen hydrolysiert wird, daß z. B. ein [23] Invertin nur noch Rohrzucker spaltet, obwohl seine wirksamen Gruppen mit denen eines aus gewöhnlicher Hefe isolierten übereinstimmen und auch die Hydrolyse der Raffinose bewirken könnten. Aus demselben Grunde darf vielleicht das Experiment E. FISCHERS[1], der mit frischer, chloroformierter Hefe α-Methylglucosid, nicht aber Malzzucker zerlegen konnte, nicht im Sinne von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[2] als Beweis für die Verschiedenheit des Maltose und des α-Methylglucosid spaltenden Enzyms angesehen werden.

Die Affinitätsänderungen des Invertins bei der Hitzezerstörung (vgl. Kap. II, Abschn. 6 der folgenden Mitteilung) täuschen eine ungleiche Beständigkeit von Saccharase und Raffinase vor. In welchen Fällen die zahlreichen Literaturangaben über verschiedene Resistenz zweier Enzyme gegen Säuren, Alkalien, Temperatur, Gifte u. dgl. auf die Affinitätsänderungen eines Enzyms zurückgeführt werden können, läßt sich aus den angeführten Messungen nicht ersehen.

Obwohl E. FISCHER die Identität von Raffinase und Saccharase, von Maltase und α-Methylglucosidase annahm und die Verschiedenheit der tierischen und pflanzlichen Enzyme vermutete, betonte er in der III. Mitteilung über den „Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme"[3] ausdrücklich, „daß der Beweis dafür fehlt und auch kaum geliefert werden kann, solange man nicht imstande ist, die Enzyme als einheitliche chemische Individuen zu charakterisieren." Wir halten eine Charakterisierung für möglich, noch ehe die Fermente einzeln in reinem Zustande isoliert sind, und zwar soll dazu die reproduzierbare und konstante Affinität dienen, die dem Enzym im identischen Milieu von Begleitstoffen unter gleichen äußeren Bedingungen gegenüber einem seiner Substrate zukommt.

[24]

2. Absolute und relative Spezifität.

Sind die Differenzen von Zeitwertquotienten durch ein wechselndes Mengenverhältnis zweier voneinander unabhängiger Enzyme zu erklären, dann müssen auch bei übereinstimmender Affinität des untersuchten Enzymmaterials verschiedene Quotienten vorkommen. Die Konstanz mindestens einer Enzymaffinität ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der Quotientenmethode, die den in üblicher Weise ermittelten Zeitwert als Maß der Enzymmenge betrachtet.

Um auch in anderen Fällen über die Spezifität der in der Natur für die Hydrolyse nahe verwandter Zuckerarten und Glucoside ausgebildeten Katalysatoren zu entscheiden, wird zu untersuchen sein, wie weit die beobachteten Schwankungen der Zeitwertquotienten durch Affinitätsunterschiede der Enzyme zu ihren Substraten bedingt sind, ob z. B. bei α- und β-Glucosidasen im Gegensatz zum Verhalten gewisser Hefesaccharasen auch beim Altern und Reinigen der Enzympräparate Affinitäts-

[1] Chem. Ber. Bd. 27, S. 3479 [1894]; Bd. 28, S. 1429 [1895]; E. FISCHER, Unters. üb. Kohleh. u. Ferm., S. 845, und zwar S. 846 und S. 850, und zwar S. 855ff. [1909].

[2] Diese Zs. Bd. 115, S. 199, und zwar S. 200 [1921] (*Abh. 76*).

[3] Chem. Ber. Bd. 28, S. 1429, und zwar S. 1438 [1895]; E. FISCHER, Unters. üb. Kohleh. u. Ferm., S. 850, und zwar S. 859 [1909].

änderungen vorkommen. In zwei Fällen können aber solche Schwankungen für das Verhältnis der Geschwindigkeiten, mit denen ein Enzym den Umsatz mehrerer Substrate bewirkt, ohne Belang sein:

1. Wenn die Dissoziationskonstanten der Enzym-Substratverbindungen übereinstimmen,

2. wenn die Dissoziationskonstanten zwar verschieden, aber so gering sind, daß die gewählte Substratkonzentration genügt, um den Einfluß enzymbindender Verunreinigungen unmeßbar klein zu machen, wenn also in bezug auf die Substratkonzentration die maximal mögliche Geschwindigkeit der Hydrolyse unter den Bedingungen der Zeitwertbestimmung praktisch erreicht ist.

Es scheint z. B. die von R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER[1] für die Spaltung einiger aromatischer β-Glucoside durch verschiedene Pflanzensamen und Emulsinpräparate beschriebene Konstanz der Zeitwertquotienten in einer der eben angeführten Möglichkeiten ihren Grund zu haben (vgl. dazu Kapitel II, S. 18 unter 2). Hier wird „zum ersten Male durch quantitative Beobachtung für ein zuckerspaltendes Enzym [25] wahrscheinlich gemacht, daß es verschiedene Substrate anzugreifen vermag[1])."

Das Verhalten dieser β-Glucosidase gegenüber β-Phenylglucosid, Helicin und Salicin bezeichnen wir als „relative Spezifität". Die Ursache dieser Erscheinung liegt in der Identität der für die verschiedenen Reaktionen notwendigen und hinreichenden wirksamen Gruppen der Enzymteilchen. Ist die für die eine Reaktion genügende Konfiguration für die zweite Reaktion zwar ebenfalls notwendig aber nicht ausreichend[2]), so können wir diesen Unterschied durch Messung von Reaktionsgeschwindigkeiten nicht erkennen, wenn die größte Empfindlichkeit den gemeinsamen Gruppen eigen ist. Kommt andererseits der für die eine Hydrolyse überflüssigen Gruppe die geringste Beständigkeit zu, dann werden wir aus der verschiedenen Empfindlichkeit auf zwei von einander unabhängige „absolut spezifische" Enzyme schließen. Das wird namentlich dann der Fall sein, wenn die wirksamen Gruppen überhaupt nichts mit einander gemein haben, mögen sie nun an demselben oder an verschiedenen Kolloidteilchen ihren Sitz haben[3]).

Die Bezeichnung absolute und relative Spezifität entnehmen wir der Immunitätslehre, wo beide Erscheinungen auch als qualitative und quantitative Spezifität unterschieden werden[4]).

Um die relative Spezifität eines Katalysators zahlenmäßig zu definieren, haben wir das Verhältnis der Dissoziationskonstanten und das der Zerfallsgeschwindigkeiten der labilen Verbindungen anzugeben, die der Katalysator mit den verschiedenen

[1] Diese Zs. Bd. 121, S. 183 [1922] (*Abh. 78*).

[1]) a. a. O. S. 184.

[2]) Vgl. die Ansichten von H. BIERRY, C. R. Bd. 148, S. 949 [1909]; Biochem. Zs. Bd. 44, S. 415, 426, 446 [1912].

[3]) Vgl. das von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT (diese Zs. Bd. 115, S. 211 [1921], und zwar S. 212f., *Abh. 63*) erweiterte Gleichnis von Schloß und Schlüssel.

[4]) Vgl. z. B. P. TH. MÜLLER, Vorlesungen über Infektion und Immunität, Jena 1917, S. 188ff.

Substraten bildet. Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten bei völliger Zurückdrängung der Dissoziation der zerfallenden Enzym-Substratverbindungen Q_∞ [vgl. Kapitel II, (15)] [26] gilt für äquimolare Mengen dieser Verbindungen und gibt das für die Nebenwirkung günstigste Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten an, das mit einer gegebenen Katalysatormenge überhaupt erreichbar ist. Q_∞ soll als relative „Leistungsfähigkeit" des Enzyms bezeichnet werden. Das wechselnde Vereinigungsbestreben des Enzyms mit den einzelnen Substraten kommt darin nicht zum Ausdruck. Dazu ist die Messung der Affinitätskonstanten notwendig, durch deren größte wir die Hauptwirkung (vgl. Kap. II, S. 17) des Enzyms definieren. Zur Orientierung über die Nebenwirkungen genügt es, die Größe Q_M [Gleichung (22), Kap. II], die wir als „mittlere Spezifität" bezeichnen, z. B. an verschiedenem Invertinmaterial auf ihre Konstanz bei der Hydrolyse von Raffinose, Gentianose, Stachyose, Verbascose, Asparagose usw. zu prüfen. Im Gegensatz zur Leistungsfähigkeit, die nur durch Extrapolation zugänglich ist, läßt sich die mittlere Spezifität — soweit unsere Erfahrungen reichen — auch bei α- und β-Glucosidasen experimentell direkt ermitteln.

Indem man die Konstanz dieser Größen an Stelle der Konstanz der früheren Zeitwertquotienten als Beweis für den Zusammenhang zweier Enzymwirkungen betrachtet, eliminiert man den Einfluß enzymbindender Verunreinigungen auf das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten. Voraussetzung ist, daß dem gebundenen Enzym keine katalytische Wirksamkeit mehr zukommt. Diese Voraussetzung wird z. B. in der folgenden Mitteilung für das Invertin durch die Konstanz von Leistungsfähigkeit und mittlerer Spezifität gegenüber dem Rohrzucker und seinem Galaktosid, der Raffinose, formel bestätigt gefunden. Aber es scheint kaum möglich, daß die Verunreinigungen der Saccharaselösungen sich neben dem in mehr als tausendfachem Überschuß vorhandenen Rohrzucker durch eine Konkurrenzreaktion im Sinne von (6) die nötige Geltung verschaffen, um die großen Affinitätsverschiedenheiten des Enzyms gegenüber der Saccharose zu erklären. Die Dissoziationskonstante der Verbindung, die diese Verunreinigung mit den wirksamen Gruppen der Saccharase eingeht, müßte etwa ebenso gering sein, wie ihre molare Konzentration in der Bestimmungslösung. [27] Auch weist die wechselnde Kinetik des Invertins und die Wirkung inaktivierter Enzymlösungen auf die Inversionsgeschwindigkeit darauf hin, daß im Sinne von (8) auch dem gebundenen Invertin die Fähigkeit der Zuckerhydrolyse noch zukommt. Theoretisch ist in diesem Falle eine exakte Proportionalität der Affinitätskonstanten nicht zu erwarten, und darum wollen wir die in der folgenden Mitteilung aus den angeführten Messungen der Dissoziationskonstanten sich ergebende Beziehung nur im Sinne einer auffallenden Parallelität, nicht einer strengen Proportionalität verstehen.

Unabhängig von diesen Vorstellungen über die Feinstruktur der wirksamen Gruppen ergibt die Konstanz der relativen Spezifität im Verein mit Gleichung (14):

In jeder Enzymlösung stehen demnach die molaren Konzentrationen der beiden Fermente unabhängig vom wechselnden Betrage der Zeitwertquotienten in einem konstanten Verhältnis zueinander.

Das wesentliche Kriterium für die Identität ist aber folgendes: Stimmen die Enzympräparate in ihrer Affinität zu dem einen Substrat überein, so muß dies auch dem zweiten gegenüber der Fall sein und es muß das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten immer das gleiche sein. Ändert sich die eine Affinität, so tut es die zweite auch, und damit verschiebt sich der Zeitwertquotient. Durch welche Gesetzmäßigkeit die beiden Affinitätskonstanten dabei verknüpft bleiben, hängt vom Mechanismus der Fremdkörperwirkung ab.

Zeitschrift für physiologische Chemie 125, S. 28 [1923].

81. ÜBER SPEZIFITÄT DER ENZYME.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und RICHARD KUHN.

II. Saccharase- und Raffinasewirkung des Invertins.

Von RICHARD KUHN.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 18 Abbildungen im Text.

(Der Redaktion zugegangen am 6. September 1922.)

Inhaltsübersicht.

[29]

I. Einleitung.

Der Mechanismus der enzymatischen Rohrzuckerspaltung durch das in den üblichen Kulturhefen enthaltene Invertin ist in den letzten Jahren durch bedeutsame Untersuchungen von L. MICHAELIS weitgehend aufgeklärt worden. Die Inversionsgeschwindigkeiten, die durch eine bestimmte Enzymmenge in Rohrzuckerlösungen verschiedener Konzentration bewirkt werden, wurden von L. MICHAELIS und M. L. MENTEN[1] unter der Annahme gedeutet, daß zwischen Enzym und Substrat ein Gleich-

[1] Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913].

gewicht bestehe, das durch das Massenwirkungsgesetz geregelt wird, und daß die Anfangsgeschwindigkeit des Umsatzes der Konzentration der undissoziierten Rohrzucker-Invertin-Verbindung proportional sei. Die Dissoziationskonstante der Saccharase-Saccharose-Verbindung wurde bei 25° und einer [H˙] von $3 \cdot 10^{-5}$ zu 0,016 bestimmt. Aus dem Einfluß von Fructose und Glucose auf die Inversionsgeschwindigkeit konnte ferner die Affinität des Enzyms zu den Spaltprodukten ermittelt und daraus eine Reaktionsgleichung der enzymatischen Rohrzuckerspaltung theoretisch abgeleitet werden, die mit den Ergebnissen kinetischer Messungen in bester Übereinstimmung stand. Die von L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN[2] untersuchte Wirkung der H˙-Ionen auf das Invertin kommt nach L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN[3] dadurch zustande, daß der Enzymsubstratkomplex eine Säure von der Dissoziationskonstante $2 \cdot 10^{-7}$ darstellt und daß nur der undissoziierte Anteil derselben in irreversibler Weise in Enzym + Glucose + Fructose zerfällt. Diese Ansichten lassen sich in folgendem Schema zusammenfassen:

Invertin + Rohrzucker ⇄ (Invertin-Rohrzucker) → Invertin + Glucose + Fructose
I ⇅ II III
(Invertin-Rohrzucker)′ + H˙

Es ist denkbar, daß die H˙-Wirkung darin besteht, daß durch Änderung der Reaktionsfähigkeit von Enzym oder Zucker [30] das Gleichgewicht I bei verschiedener h[1]) verschieden liegt und daß ein Gleichgewicht II überhaupt nicht existiert. In diesem Fall müßte jedoch der Parameter der Aktivitäts-p_H-Kurve in hohem Maße von der Rohrzuckerkonzentration abhängen[2]), während er tatsächlich davon unabhängig ist[3]). Daraus kann man schließen, daß das Gleichgewicht I, für das bisher nur Messungen bei optimaler h vorliegen, durch Aciditätsänderungen nicht beeinflußt wird. Im II. Kapitel der vorliegenden Abhandlung wird diese wichtige Schlußfolgerung direkt experimentell bestätigt. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration läßt sich also ebenso wie der Primärvorgang der Reaktion, die Vereinigung des Invertins mit dem Rohrzucker, gesondert experimentell untersuchen.

Mit einem Invertinpräparat aus schwedischer Brauereihefe (Minutenwert 5,1) haben H. v. EULER und J. LAURIN[4]) die Lage des Gleichgewichts I bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Der Temperaturkoeffizient der Dissoziationskonstanten betrug nur etwa 1% per Grad, ihr Absolutwert bei 25° 0,026. Der bedeutende Unterschied gegenüber dem von MICHAELIS mit einer nicht näher charakterisierten Invertinlösung erhaltenen Wert 0,016 ist ungeklärt geblieben und scheint geeignet, die Ansicht derjenigen Forscher zu stützen, die auch im Falle des Invertins die Vereinigung von Enzym und Substrat als Adsorptionsvorgang auffassen. Denn die Oberfläche des kolloiden

[2] Biochem. Zs. Bd. 35, S. 386 [1911].
[3] Biochem. Zs. Bd. 110, S. 217 [1920].
[1]) h = Wasserstoffionenkonzentration, vgl. L. MICHAELIS, Die Wasserstoffionenkonzentration, II. Aufl. (Springer, Berlin), Teil I, S. 10 [1922].
[2]) L. MICHAELIS, Biochem. Zs. Bd. 60, S. 91 [1914].
[3]) L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN, a. a. O.
[4]) Diese Zs. Bd. 110, S. 55 [1920].

Enzymteilchens wird sich je nach Teilchengröße und Natur der Begleitstoffe, mit denen es assoziiert ist, leichter oder schwieriger mit dem Substrat sättigen. Das Invertin von MICHAELIS hätte schon in 0,016n-Rohrzuckerlösung die Hälfte seiner aktiven Oberfläche mit dem Disaccharid beladen, während dies beim Invertin der schwedischen Brauereihefen erst in 0,026n-Lösung der Fall ist. Die Konstanz dieser [31] Werte bei wechselnder *h* wäre kolloidchemisch dahin zu interpretieren, daß die Adsorptionsisothermen bei Änderung der Teilchengröße oder bei Umladung des Kolloids affine Adsorptionskurven im Sine von W. MECKLENBURG[1] bleiben.

Die Annahmen von MICHAELIS sind bis heute auch an anderen Enzymreaktionen einer eingehenderen Prüfung nicht unterzogen worden. Die entscheidende Frage, ob für ein Enzym überhaupt eine konstante Affinität zu seinem Substrat charakteristisch ist und wie weit dies zutrifft, ist unbeantwortet.

Die Fortschritte der präparativen Methodik, die es ermöglichen, Invertin frei von Eiweiß, Kohlehydrat und Phosphor, überhaupt frei von chemisch nachweisbaren Gruppen in mehr als 1500facher Konzentration gegenüber dem Ausgangsmaterial darzustellen[2], fordern einen Vergleich der Eigenschaften des Enzyms bei wechselndem Reinheitsgrad.

Im Abschnitt D der III. Mitteilung über Invertin suchten R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN[3] die Grenzen für die Einflüsse der Begleitstoffe und der Verteilung auf die Eigenschaften des Invertins. Es wurde gezeigt, daß im Gegensatz zur Adsorptionsaffinität, Fällbarkeit, Temperaturempfindlichkeit, zum Verhalten im elektrischen Feld usw. die Wirksamkeit des Enzyms weder qualitativ noch quantitativ durch die mit ihm vergesellschafteten Stoffe beeinflußt wird. Diese Konstanz der Invertinwirkung, die sich aus zahllosen Messungen, mit denen die präparative Arbeit verfolgt wurde, ergab, führte zur Ansicht, daß die Wirkung des Invertins durch seine Masse stöchiometrisch gegeben sei.

Für viele Reinigungsoperationen ist jedoch der direkte Beweis für die Konstanz der Invertinwirkung noch nicht mit der nötigen Schärfe erbracht und er ist bei empfindlichen Präparaten von hoher Konzentration kaum mehr möglich. Auch muß berücksichtigt werden, daß die Analysen in [32] Rohrzuckerlösung von solcher Konzentration ausgeführt werden, daß das Invertin fast vollständig an den Zucker gebunden ist, so daß erst recht beträchtliche Änderungen der Affinität einen die Fehlergrenzen der Zeitwertbestimmung übersteigenden Ausschlag geben würden. Im zweiten Kapitel der vorliegenden Arbeit wird daher die Konstanz der Affinität des Invertins zum Rohrzucker in zweifacher Hinsicht geprüft: durch Vergleich von Invertin verschiedenen Reinheitsgrades und durch Vergleich des Invertins verschiedener Heferassen.

[1] Zs. physikal. Chem. Bd. 83, S. 609 [1913].

[2] R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Liebigs Ann. der Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21) und Bd. 427. S. 111 (1921/22); R. WILLSTÄTTER, JOH. GRASER und R. KUHN, diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922].

[3] A. a. O., S. 45.

Die Dissoziationskonstante der Saccharase-Saccharose-Verbindung eines Autolysats der Löwenbräuhefe wird mit daraus nach verschiedenen Verfahren dargestellten Präparaten vom Minutenwert 0,65 und 0,85 verglichen und übereinstimmend = 0,029 bei 30° gefunden.

Die Erfahrungstatsache von der Konstanz der Invertinwirkung bestätigend und zugleich vertiefend, erweist sich die Affinität zum Rohrzucker als völlig unabhängig von den wechselnden Adsorptionsaffinitäten, der Teilchengröße und der elektrischen Ladung, die dem Enzym als Kolloid zukommen.

Allein die Differenz zwischen dem von L. Michaelis einerseits, von H. v. Euler und uns andererseits bestimmten Wert der Dissoziationskonstanten läßt sich nicht etwa auf eine verschiedene Handhabung der Methodik zurückführen. Invertinlösungen und -präparate, die aus anderen Hefelieferungen der Löwenbrauerei dargestellt waren, ergaben 0,040, Invertinlösungen aus Brennereihefen z. B. 0,016 für die Dissoziationskonstante der Saccharase-Saccharose-Verbindung, also Unterschiede von 250% des kleinsten beobachteten Wertes.

Die Tatsache, daß scheinbar jede Hefe ihr eigenes Invertin mit charakteristischer und konstanter Affinität besitzt, führt zu der Frage, ob diese Erscheinung durch eine Verschiedenheit chemisch aktiver Gruppen bedingt ist und ob die Mannigfaltigkeit der gemessenen Affinitäten vielleicht im wechselnden Mengenverhältnis zweier einander nahestehender Invertine ihren Grund hat. Unsere Beobachtung, daß „arteigene" und „artfremde" Kochsäfte die Affinität des Invertins zum Rohrzucker [33] in gewissen Fällen herabzusetzen vermögen, ist aber besser durch Bindung des Enzyms an seine Zersetzungsprodukte zu deuten.

Die im zweiten Kapitel mitgeteilten Versuche machen es nötig, unsere Vorstellung über die Beziehung des Zeitwerts einer Enzymreaktion zur Enzymmenge zu revidieren. Für Invertin von niederer Affinität (z. B. Löwenbräu-invertin) scheint der Menge-Zeit-Quotient[1] ein völlig korrektes Maß der Enzymmengen darzustellen, wenn wir die präparative Arbeit vom Pilz durch alle Reinigungsoperationen hindurch bis zu den besten Präparaten verfolgen.

Wenn aber Präparaten von hoher Affinität (z. B. aus dänischer Brennereihefe) schon viel verdorbenes Enzym beigemischt ist, so können die Enzymmengen, auf die wir aus dem Zeitwert schließen, in allerdings geringer Weise gefälscht sein. Vom relativen Invertingehalt verschiedener Hefen und der aus verschiedenen Hefen gewonnenen Lösungen und Präparate gibt uns jedoch das Verhältnis der Zeitwerte ein unrichtiges Bild. Die Größe des Fehlers ist bestimmbar aus den Affinitäten der beiden Invertinwirkungen und der Konzentration der Rohrzuckerlösung, in der die Zeitwerte ermittelt wurden. Das Verhältnis der Enzymmengen wird in diesem Fall durch

[1] R. Willstätter und F. Racke, Liebigs Ann. der Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 8. Über die Ausführung der Zeitwertsbestimmung vgl ferner R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn, diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 23f.

Vergleich gleicher Bruchteile der maximal möglichen Inversionsgeschwindigkeiten bestimmt.

Sucht man daher die Frage, wie weit die Hefe oder verschiedene Pflanzensamen für die Hydrolyse nahe verwandter Stoffe, wie α-Methyl- und α-Äthylglucosid, Saccharose und Raffinose oder β-Methyl- und β-Phenylglucosid absolut spezifische Katalysatoren zur Verfügung stellen, durch Bestimmung von Zeitwertquotienten[2] zu entscheiden, so muß die Abhängigkeit des Zeitwertquotienten von den Einzelaffinitäten der Enzyme [34] zu ihren Substraten und von der Substratkonzentration berücksichtigt werden.

Unter der Voraussetzung, daß bei bestimmter h und Temperatur die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion durch Zusammensetzung und Konzentration der Enzymsubstratverbindung bzw. durch den adsorbierten Betrag des Substrats gegeben sei, wurden in der vorangehenden Abhandlung die Grundlagen einer allgemeinen Theorie der Enzymspezifität entwickelt, die es gestattet, durch Messung von Reaktionsgeschwindigkeiten zwischen absoluter und relativer Spezifität der Enzyme zu entscheiden.

Für den Fall eines Dissoziationsgleichgewichts zwischen Enzym und Substrat im Sinne von L. MICHAELIS wird, wenn einem Enzym neben seiner Hauptwirkung noch ein oder mehrere Nebenwirkungen zukommen, die Hauptaffinität zu den Nebenaffinitäten unabhängig vom numerischen Betrag der Einzelgröße in einem konstanten Verhältnis stehen, und es wird der molare Umsatz der einzelnen Substrate derselben Bedingung genügen, wenn gleiche Bruchteile der maximal möglichen Reaktionsgeschwindigkeiten miteinander verglichen werden. Eine Verschiedenheit des Zeitwertquotienten bei Konstanz mindestens einer Enzymaffinität spricht dagegen für die Existenz von zwei unabhängigen, in wechselndem Mengenverhältnis vorkommenden, verschieden beständigen, absolut spezifischen Enzymen.

An Hand dieser Theorie wird im dritten Kapitel die spezifische Natur von Saccharase und Raffinase an Invertinlösungen und -präparaten verschiedener Herkunft und Reinheit geprüft.

Die von R. WILLSTÄTTER und R. KUHN[1]) beobachteten Schwankungen des Quotienten $\frac{\text{Zeitwert für Raffinase}}{\text{Zeitwert für Saccharase}}$, die sich beim Vergleich verschiedener Hefen ergaben, sind nicht durch ein wechselndes Mengenverhältnis absolut spezifischer Hefenenzyme zu erklären.

Sie sind bedingt durch die wechselnde Affinität, die dem Invertin verschiedener Hefen gegenüber dem Di- und [35] Trisaccharid eigen ist. Das Verhältnis der Dissoziationskonstante der Saccharase-Saccharose-Verbindung K_S zur Dissoziationskon-

[2] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 199 [1921]; R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, ebenda, Bd. 115, S. 180 [1921]; R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI, ebenda, Bd. 117, S. 172 [1921]; R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER, ebenda, Bd. 121, S. 183 [1922].

[1]) A. a. O.

stanten der Raffinase-Raffinose-Verbindung K_R ist für alle untersuchten Invertine übereinstimmend:

$$K_S:K_R = 1:16.$$

Ebenso erweist sich das Verhältnis des molaren Umsatzes von Rohrzucker und Raffinose, den eine bestimmte Enzymmenge unter optimalen Bedingungen in gleichen Zeiten bewirken könnte, der für unendlich hohe Substratkonzentration extrapolierte Zeitwertquotient Q_∞ als konstant.

$$Q_\infty = 2,0.$$

Diese Zahlen liefern zum ersten Male ein Bild von der relativen Spezifität eines Enzyms zu zwei Substraten: Wenn wir die Rohrzucker-Invertin- und Raffinose-Invertin-Verbindung in reinem Zustand isolieren könnten und sie in solcher Konzentration in Wasser von 30° lösten, daß die Konzentration der undissoziierten Enzymsubstratverbindungen je 1 Mol pro Liter betrüge, so wäre neben dem Trisaccharid 4mal mehr freies Invertin in Lösung als neben dem Disaccharid. Für jedes in Melibiose + Fructose zerfallende Raffinosemolekül würden dann in der gleichen Zeit zwei Rohrzuckermoleküle in Glucose + Fructose gespalten.

Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung — die Identität von Saccharase und Raffinase — scheint bedeutungsvoll:

1. Für die Beurteilung der nach den Adsorptionsmethoden gewonnenen Enzympräparate, die sich chemisch einheitlicher darbieten, als es bisher angenommen wurde[1].

2. In teleologischer Hinsicht, indem auch in anderen Fällen ein nicht übermäßig reicher Schatz von Katalysatoren der Natur den Umsatz selten vorkommender und künstlich dargestellter Stoffe ermöglichen dürfte.

[36] II. Die Affinität des Hefeninvertins zum Rohrzucker.

1. Ausführung und Berechnung der Versuche.

Nach dem Vorgang von L. MICHAELIS haben wir die durch gleiche Enzymmengen bei wechselnder Rohrzuckerkonzentration bewirkten Inversionsgeschwindigkeiten gemessen und als Maß für die Konzentration der Saccharase-Saccharose-Verbindung betrachtet. Die Enzymmengen wurden so bemessen, daß z. B. in 0,1 n-Lösung nach 1/4 Stunde 3 bis 10% des vorhandenen Zuckers in Glucose und Fructose gespalten waren. Bei dem großen Überschuß, in dem der Rohrzucker neben dem Enzym vorhanden ist, können die Resultate nicht von der für eine Versuchsreihe angewandten Enzymkonzentration abhängen. Im Bereich 1:3 haben H. v. EULER und J. LAURIN[1]) die Unabhängigkeit der Affinitätskonstante von der Enzymkonzentration geprüft und bestätigt gefunden. Im Gebiete von p_H 3,3 bis 5,5 sind nach denselben Autoren auch Änderungen der Acidität ohne Einfluß auf das Resultat (vgl. auch Abschn. 4

[1] R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Liebigs Ann. der Chem. Bd. 427, S. 111 [1921/22], und zwar S. 117.

[1]) Diese Zs. Bd. 110, S. 55 [1920].

dieses Kapitels). Die Inversionstemperatur von 30° war während jeder Versuchsreihe auf ±0,03° konstant. Als Puffer wurden je 2 ccm 20proz. NaH_2PO_4-Lösung auf 100 ccm Zuckerlösung angewandt, von der 4mal 20 ccm entnommen und in 5 ccm 2n-Sodalösung eingetragen wurden, die erste Probe nach 1,5, die letzte nach etwa 50 Minuten. Der Verlauf der Hydrolyse wurde nach Ausgleich der Temperatur und vollendeter Mutarotation der Glucose (30 bis 80 Minuten nach der Stoppung) durch Polarisation in weitlumigen 2dm-Röhren in einem Halbschattenapparat der Firma Schmidt & Haensch mit dreiteiligem Gesichtsfeld bestimmt. Bei sorgfältigem Aufschrauben der Deckgläschen war es möglich, aus dem Mittel von 6 bis 10 Ablesungen α_D-Differenzen von 0,003° zu schätzen, mit einem möglichen Fehler von ±0,005°. Die maximale Temperaturschwankung während der vier zu einem Versuch gehörigen Polarisationen war < 0,5°. Die für die Zeit $t = 0$ extrapolierte Anfangsdrehung α_0 liegt den Angaben über die [37] Normalität der Saccharoselösung, die im allgemeinen zwischen 0,1 und 0,01, in einigen Fällen zwischen 0,005 und 0,2 variiert wurde, zugrunde.

Die Normalität wurde unter Benutzung der Beziehung $n:\alpha_0 = 0{,}1387:5{,}05$ berechnet. Der Unterschied zwischen α_0 und dem ersten direkt beobachteten Drehungswinkel lag für die konzentriertesten Lösungen zwischen 0,02 und 0,03°. Um das relative Maß der Anfangsgeschwindigkeiten zu ermitteln, zogen wir — gleichfalls dem Vorschlag von MICHAELIS folgend — zwischen den auf Millimeterpapier (5 Minuten = 0,10° Drehungsabnahme = 10 mm) eingezeichneten Beobachtungspunkten mit freier Hand eine Kurve, die möglichst die für den zeitlichen Verlauf der Rohrzuckerspaltung charakteristische Gestalt hat und in bezug auf welche die einzelnen Punkte möglichst symmetrisch liegen. Dieses Verfahren scheint uns namentlich bei niederen Zuckerkonzentrationen richtiger als die durch Kombination von je zwei Messungen mögliche Berechnung des Mittelwertes für die Drehungsänderung pro Minute.

Da alle Schlußfolgerungen in hohem Maße von der Genauigkeit und Gleichmäßigkeit der Ausführung abhängen, teilen wir die Kurven am Ende der Abhandlung mit. Die auf diese Weise für 10 oder 15 Minuten interpolierten, auf 0,005° geschätzten Drehungsabnahmen stellen das relative Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeiten dar. Die Dissoziationsrestkurven ermitteln wir daraus mit Rücksicht auf die Verhältnisse bei der Raffinasewirkung (vgl. das folgende Kapitel, 1. Abschnitt), um später nur gleichartig gewonnene Zahlen zu vergleichen, rechnerisch durch Probieren, welcher Parameter die Neigung der Kurve am besten wiedergibt. Da schon geringfügige Aktivitätsänderungen der Enzymlösung während einer Versuchsreihe sich stark geltend machen können, wurde insbesondere bei den verdünnten Lösungen hochaktiver Präparate darauf geachtet, daß die an 2 Tagen ausgeführten Bestimmungen sich nicht auf anschließende, sondern auf weit ineinandergreifende Zuckerkonzentrationen bezogen. Trotzdem beträgt der mögliche Fehler von K_S je nach der Größe der Drehungsabnahmen ±20 bis 30%. Der wahrscheinliche Fehler eines [38] aus 5 bis 8 Versuchen ermittelten K_S-Wertes dürfte ±5% betragen und ±10% nicht übersteigen.

2. Das Enzymmaterial.

Um die Affinitäten des Invertins verschiedener Herkunft und verschiedenen Reinheitsgrades zum Rohrzucker zu vergleichen, wurden folgende Invertinlösungen und -präparate in den Bereich der Untersuchung gezogen:

a) Ein nach dem Verfahren von R. WILLSTÄTTER und F. RACKE[1] aus Löwenbräuhefe bei saurer Reaktion gewonnenes Autolysat. Zeitwert bezogen auf Trockengewicht 180, $3^1/_2$ Monate alt, mit 10% Kaolin geklärt.

b) Eine aus diesem Autolysat nach der Kaolinmethode von R. WILLSTÄTTER und W. WASSERMANN[2] dargestellte hefegummifreie Invertinlösung vom Zeitwert 0,85 Minuten.

c) Das in der III. Mitteilung über Invertin beschriebene Präparat n_1.[3] Zeitwert = 0,64 Minuten, P-Gehalt = 0,006%.

d) Das ebenfalls durch Bleifällung isolierte Präparat *q* derselben Abhandlung[4] (Zeitwert = 0,26).

e) Das durch monomolekulare Kinetik ausgezeichnete Präparat *l* vom günstigsten bisher beobachteten Zeitwert 0,20 (in frischem Zustand).[5] Minutenwert zur Zeit des Versuches = 0,37, noch melibiasehaltig.[6]

f) Dänisches Invertin. Eine als „Fineste Pressegaer" bezeichnete Brennereihefe der Dansk Gaer-Central in Kopenhagen, die wir der gütigen Vermittlung des Herrn Prof. Dr. ALFRED JÖRGENSEN verdanken (November 1921), wurde, mit Wasser im Verhältnis 1:2 verdünnt, 5 Tage der Autolyse bei neutraler Reaktion[7] überlassen. Der vor Abtrennung der Heferückstände [39] mit Essigsäure angesäuerte Auszug, der besonders reichliche Mengen von Aminosäuren auskrystallisieren ließ, wurde nach 6 Monaten mit 10% eines elektroosmotisch gereinigten Kaolins geklärt. Er erwies sich als frei von Melibiase.

g) Ein völlig eiweißfreies Invertinpräparat aus amerikanischer Brauereihefe, das Herr L. WALLERSTEIN in New York dargestellt und in freundlichster Weise zur Verfügung gestellt hatte. Bei einem Saccharasezeitwert von 6,3 Minuten vermochte es auch noch Melibiose mit großer Leichtigkeit zu spalten.

h) Invertin der Rasse II und

i) Invertin der Rasse XII. Die beiden Brennereihefen trafen am 3. VI. 1922 vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin-N., Seestraße 13, in München ein. Die kaolingeklärten Autolysate (1 Teil Hefe + 2 Teile Wasser + Toluol, 6 bzw. 7 Tage) vermochten Melibiose nicht zu spalten.

[1] Ann. d. Ch. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 27ff.
[2] IV. Mitteilung über Invertin, Diese Zs. Bd. 123, S. 181 [1922].
[3] Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar Tab. 7, S. 33.
[4] Ebenda Tab. 6, S. 27.
[5] Ebenda Tab. 8, S. 37.
[6] Vgl. R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921], und zwar S. 188.
[7] Unter Zusatz von Ammonphosphat, R. WILLSTÄTTER und R. RACKE, Ann. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 30ff.

3. Unabhängigkeit der Affinität vom Reinheitsgrad.

Das eben beschriebene Autolysat *a* der Löwenbräuhefe weist die nämliche Abhängigkeit der Saccharasewirkung von der Rohrzuckerkonzentration auf wie das aus ihm gewonnene Präparat *b* von mehr als 200 mal höherem Reinheitsgrad. Wie aus Tab. 1 und 2 hervorgeht, lassen sich beide Kurven am besten durch den Parameter $K_S = 0{,}029$ darstellen, also durch denselben Wert, den H. v. EULER und J. LAURIN bei der gleichen Temperatur ermittelt haben. Die erste Spalte der folgenden Tabellen enthält neben der extrapolierten Anfangsdrehung α_0 die daraus für Versuchsbeginn berechnete Zuckerkonzentration [S] in Mol pro Liter. Die in den zugehörigen Abb. 1a und 2a durch Pfeile hervorgehobenen Zeiten, auf die sich die Angabe der relativen Anfangsgeschwindigkeiten bezieht, sind am Kopfe der sechsten Spalte in Klammern beigefügt. In der 7. und 8. Spalte sind die auf die im 1. Abschnitt beschriebene Weise berechneten und gefundenen, mit 100 multiplizierten Werte des Dissoziationsrestes ϱ enthalten. Vorzeichen und Größe der Differenz Δ zwischen den theoretischen und beobachteten Werten ist aus der letzten Kolumne zu ersehen.

[40]

Tabelle 1.
Extrakt aus Löwenbräuhefe.
(Invertin *a* des Abschnitts 2; 1 : 10 verdünnt. Inversionstemperatur: 30,00 ± 0,03°, Polarisation bei 21—22°. K_S = 0,029.)

α_0 [S]	− log [S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (15 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
4,98 (0,137)	0,86	15,5	4,745	0,235	22	82,5	81,5	— 1,0
		26,5	4,59	0,39				
		37,5	4,445	0,535				
3,62 (0,0995)	1,00	15,8	3,40	0,22	20,5	77,5	76,5	+ 1,0
		27,0	3,24	0,38				
		39,5	3,085	0,535				
2,46 (0,0676)	1,17	14,0	2,285	0,175	19	70	70,5	+ 0,5
		27,5	2,105	0,355				
		41,5	1,96	0,50				
0,955 (0,0262)	1,58	15,0	0,84	0,115	12,5	47,5	46,5	— 1,0
		26,0	0,73	0,225				
		39,8	0,62	0,335				
0,493 (0,0136)	1,87	16,8	0,395	0,10	9	32	33	+ 1,0
		32,7	0,305	0,19				
0,368 (0,010)	2,00	15,2	0,30	0,068	7	26	26	± 0,0
		29,7	0,245	0,123				
		46,4	0,198	0,17				
0,289 (0,0079)	2,10	17,8	0,230	0,06	6	22	22	± 0,0
		31,8	0,180	0,11				
		40,8	0,15	0,14				

Dem durch einmalige Adsorption mit Kaolin aus stark verdünnter Lösung und Elution mit Ammoniak isolierten Präparat steht das im vorigen Abschnitt unter c) angeführte Invertin gegenüber, das den ähnlichen Reinheitsgrad erst nach vier Bleifällungen und einer Tonerdebehandlung erreicht hatte, jedoch im Gegensatz zu ersterem

nicht nur von Kohlehydrat, sondern auch von Eiweiß und Phosphor frei war[1]. Trotzdem wird die [41] Abhängigkeit seiner Saccharasewirkung vom log der reziproken Saccharosekonzentration am besten durch denselben logarithmischen Parameter 1,54 wiedergegeben (Abb. 3b).

Tabelle 2.
Invertin vom Zeitwert 0,85 (*b* des Abschnitts 2).
Je 2 ccm der 50fach verdünnten Lösung. Inversionstemperatur: 29,92 ± 0,02°, Polarisation bei 20°. $K_S = 0{,}029$.

s_0[S]	− log[S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (15 Min.)	100 ρ ber.	100 ρ gef.	Δ
5,36	0,83	10,5	5,21	0,15	21,5	83,5	83	— 0,5
(0,147)		26,8	4,985	0,375				
		44,5	4,75	0,61				
4,95	0,87	14,5	4,74	0,21	21,5	82,5	83	+ 0,5
(0,136)		28,0	4,55	0,40				
3,553	1,01	15,0	3,353	0,20	20	77	77	± 0,0
(0,0976)		34,7	3,12	0,433				
2,48	1,17	15,0	2,30	0,18	18	70	69,5	— 0,5
(0,0681)		30,8	2,105	0,375				
1,415	1,41	17,0	1,245	0,17	15	57,5	58	+ 0,5
(0,0389)		28,2	1,135	0,28				
		45,1	0,995	0,42				
0,982	1,57	13,5	0,860	0,122	12,5	48,5	48,5	± 0,0
(0,027)		27,6	0,755	0,227				
		39,5	0,685	0,297				
0,735	1,69	15,9	0,625	0,110	10,5	41	40,5	— 0,5
(0,0202)		30,4	0,515	0,22				
		49,0	0,415	0,32				
0,357	2,01	13,1	0,305	0,052	6	25,5	23	— 2,5
(0,0098)		33,3	0,24	0,117				

Im folgenden Kapitel (Abschn. 4) wird gezeigt, daß sich die Unabhängigkeit der Aktivitäts-[S]-Kurve vom Reinheitsgrad noch für viele andere Invertinlösungen aus Löwenbräuhefe auf indirektem Wege beweisen läßt. Die im Hefeauszug enthaltenen Begleiter des Invertins können demnach nicht — soweit es sich um Stoffe aus der Klasse der Proteine, um [42] Phosphorverbindungen und höhere Kohlehydrate handelt — durch Bindung der aktiven Gruppen des Enzyms seine Wirksamkeit beeinflussen. Und doch ist das Invertin aufs innigste assoziiert mit all diesen Körpern, von denen sein wechselndes Verhalten gegen Adsorptionsmittel, seine elektrische Ladung, seine Stabilität und vieles andere bestimmt wird.

Wenn das Enzym aus einem kolloiden Komplex besteht, dessen reaktionsfähige Gruppen rein chemisch wirken, so kann mit den im natürlichen Milieu vorkommenden Begleitstoffen nur der kolloide Komplex selbst verankert sein.

Man könnte einwenden, daß die von R. WILLSTÄTTER und W. WASSERMANN[1]) neuerdings gemachten Beobachtungen über die Leichtigkeit, mit der die Komplexe,

[1] III. Mitteilung über Invertin, Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 38.
[1]) Diese Zs. Bd. 123, S. 181 [1922].

Tabelle 3.
Saccharasewirkung des Präparates *c*.
(Puffer: n/50-Standardacetat, $p_H = 4{,}63$. Inversion bei $30{,}00 \pm 0{,}03°$, Polarisation bei 19,5—21°. $K_S = 0{,}029$.)

$\alpha_0[S]$	$-\log[S]$	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (8 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
7,255 (0,199)	0,70	14,0	6,72	0,535	30	87	87	± 0,0
		22,1	6,45	0,805				
3,595 (0,099)	1,00	10,0	3,25	0,345	27,5	77,5	79,5	+ 2,0
		18,0	2,99	0,605				
1,41 (0,0388)	1,41	15,0	1,045	0,365	20	57	58	+ 1,0
		22,0	0,90	0,51				
		30,5	0,73	0,68				
0,685 (0,0189)	1,72	15,1	0,45	0,235	13,5	39,5	39,5	± 0,0
		23,5	0,34	0,345				
		32,0	0,225	0,46				
0,290 (0,0080)	2,10	14,2	0,16	0,13	7,5	21,5	21,5	± 0,0
		25,2	0,09	0,20				
		38,1	0,00	0,29				

die das Invertin mit den natürlichen Begleitern bildet, durch bloßes Verdünnen der [43] Enzymlösungen gelockert werden, es wohl möglich erscheinen lassen, daß auch die aktiven Gruppen der Saccharase mit den Verunreinigungen zusammentreten, daß diese Bindung aber unter den Bedingungen, unter denen die Aktivität des Enzyms gemessen wird, zerfällt, und daß sich die niedere Affinität dieser Körper neben der des Rohrzuckers nicht Geltung verschaffen kann. Wir sind aber imstande, Invertinkomplexe[1] darzustellen (z. B. mit Eisenoxydhydrat, besser mit Aluminiumhydroxyd oder Kohle), die bei der Einwirkung des Rohrzuckers nicht im geringsten zerlegt werden. Da auch hier das Enzym seine Wirksamkeit quantitativ behält, werden wir zu der Anschauung geführt, daß die in der Wirkungssphäre des kolloiden Trägers sich abspielenden Vorgänge durch räumliche Trennung für die wirksamen Gruppen des Enzyms unbemerkt bleiben.

Darum kann die Wirksamkeit des Invertins von den Kolloideigenschaften des Gesamtteilchens, an dem die Rohrzuckerhydrolyse vor sich geht, nicht beeinflußt werden. „Das System von Kolloiden bestimmt nicht, wie das Invertin wirkt, sondern hat Einfluß darauf, ob es wirksam bleibt."[2] Der kolloide Träger ist die Stelle, an der die Begleiter verankert sind, hier geht das allgemeine Spiel der Oberflächenkräfte vor sich, abgeschirmt von der Stelle, wo die spezifischen Kräfte des Katalysators sich betätigen. Hierher gelangt der Rohrzucker, seine Spaltungsprodukte und einige andere Zuckerarten, hierher gelangen die Gifte. Ob da bestimmte chemische Gruppen oder spezifische Oberflächenkräfte ihren Sitz haben? Die Unabhängigkeit der Invertinwirkung vom Kolloidzustand der Teilchen, die Konstanz der Affinität zum Rohr-

[1] O. MEYERHOF, Pflügers Arch. Bd. 157, S. 251 [1914], und zwar S. 271; L. MICHAELIS, Biochem. Zs. Bd. 115, S. 268 [1921], mitbearbeitet von T. ROTHSTEIN; J. M. NELSON und D. J. HITCHCOCK, Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 43, S. 1956 [1921]; R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, diese Zs. Bd. 116, S. 53 [1921].

[2] R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 56.

zucker vermag darüber nicht zu entscheiden. Aber die Spezifität der Enzymwirkungen ist besser [44] mit Hilfe charakteristischer reaktionsfähiger Gruppen zu verstehen und jeder der folgenden Versuche zeigt, daß diese Wirkungen beim Invertin vom Massenwirkungsgesetz geregelt werden.

Die Adsorptionsisotherme ist am anderen, weniger interessanten Pol des Teilchens Herrscherin und es mag ihr Machtbereich bei vielen Enzymen auch für die Konzentrationsverhältnisse an den aktiven Gruppen entscheidend sein.

4. Unabhängigkeit von der Wasserstoffzahl.

Die Aktivitäts-p_H-Kurven der Enzyme sind von L. MICHAELIS unter der Annahme gedeutet worden, daß die Enzyme Elektrolyte sind und daß die Wirksamkeit entweder den Kationen, Anionen oder den undissozierten Fermentmolekülen zukommt. Um welche dieser Molekülgattungen es sich in jedem einzelnen Fall handelt und ob es möglich ist, dies durch Überführungsversuche im elektrischen Feld festzustellen[1], soll an dieser Stelle nicht besprochen werden.

Das Wesentliche der Theorie ist, daß die Wasserstoffionen das Dissoziationsgleichgewicht des Elektrolyten und damit die Konzentration der reaktionsfähigen Enzymmoleküle ändern. Demgegenüber hat H. v. EULER wiederholt[2] darauf hingewiesen, daß die Aktivitäts-p_H-Kurven auch durch Änderung der Reaktionsfähigkeit des Substrates erklärt werden können und daß Salzbildung sowie intramolekulare Umlagerung in vielen Fällen in Betracht gezogen werden muß.

Wie jedoch schon in der Einleitung bemerkt wurde, haben vor zwei Jahren L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN den Nachweis erbracht, daß die Abhängigkeit der Invertinwirkung vom p_H unabhängig ist von der Rohrzuckerkonzentration, bei der die Versuche ausgeführt werden, und sie zogen daraus den Schluß, daß nicht der wirksame Bruchteil des vorhandenen Fermentes, [45] sondern derjenige der Invertin-Rohrzucker-Verbindung geändert wird und sie haben die Elektrolytnatur dieser Verbindung zugeschrieben.

Unseres Erachtens geht aus den von MICHAELIS und ROTHSTEIN beschriebenen Versuchen allgemein hervor, daß das Wesen der h-Wirkung nicht in einer Änderung des Gleichgewichts zwischen Enzym und Zucker gesucht werden kann, daß demnach auch die Konzentration der reaktionsfähigen Moleküle des Rohrzuckers zur analytisch bestimmbaren Gesamtkonzentration unabhängig von der Wasserstoffzahl in einem konstanten Verhältnis stehen muß.

Wenn H. v. EULER[1]) mit Bezug auf das Invertin sagt: „Wir brauchen nur z. B. annehmen, daß die eine Komponente eine innere Umlagerung erfährt und daß die Form, welche sich mit der anderen Komponente verbindet, ihre maximale Konzentration bei

[1] III. Mitteilung über Invertin, S. 73ff.

[2] Chemie der Enzyme, 2. Aufl., I. Teil (Verlag J. F. Bergmann), S. 34; Vortrag a. d. Nord. Chemiker-Vers. am 2. Sept. 1920; Svensk Kemisk Tidskrift Bd. 33, S. 37, und zwar S. 39 [1921].

[1]) A. a. O.

der Acidität $p_H = 4$ bis 5 besitzt" und wenn er geltend macht[2], „daß sich die eingangs erwähnte Geschwindigkeits-p_H-Kurve berechnen läßt unter der Annahme, daß der Rohrzucker als Base, die Saccharase als Säure fungiert", so möge folgende Überlegung gestattet sein:

Wir vergleichen unter Hinweis auf die in der I. Mitteilung über Spezifität der Enzyme eingeführte Bezeichnungsweise die Saccharasewirkungen bei $p_H = 4,7$ und bei 6,7, wo durch dieselbe Enzymmenge in der gleichen Zeit nur halb soviel Rohrzuckermoleküle gespalten werden, unter der Voraussetzung, daß die Inversionsgeschwindigkeit der Konzentration der Invertin-Rohrzucker-Verbindung proportional ist und berechnen, welcher Bruchteil x der Rohrzuckermoleküle bei der $[H^{\cdot}] = 2 \cdot 10^{-7}$ wirksam ist. Es folgt

$$\frac{x \cdot [S]}{x[S] + K_S} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_S},$$

und da nach MICHAELIS und ROTHSTEIN der Faktor $\frac{1}{2}$ [46] von $[S]$ unabhängig ist, so ergibt sich, daß der wirksame Bruchteil

$$x = \frac{K_S}{2K_S + [S]}$$

von der Zuckerkonzentration selbst abhängen müßte.

Eine ganz analoge Folgerung ergibt sich für den Bruchteil der wirksamen Fermentmoleküle, wenn man die Wirkung der Wasserstoffionen durch sie erklären will. Die Folgerungen sind unabhängig davon, ob die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes berechtigt ist oder nicht. Nur der experimentell bestimmte Verlauf der Aktivitäts-p_H-Kurve und die Abhängigkeit der Inversionsgeschwindigkeiten von der Zuckerkonzentration kommt in Betracht. Die Differenz zwischen Experiment und Theorie ist fast um eine Zehnerpotenz größer als die Versuchsfehler.

Willkürlich und — wie jetzt gezeigt werden soll — unhaltbar scheint aber die Grundannahme, die sowohl L. MICHAELIS als auch H. V. EULER machen, daß durch die h Gleichgewichte verschoben werden und daß dabei die Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration der undissoziierten Invertin-Rohrzucker-Verbindung proportional bleibt.

Wir betrachten dazu das in der Einleitung wiedergegebene Schema und bezeichnen die Dissoziationsprodukte, die auf der unteren Seite des Gleichgewichtes II stehen, mit σ und H^+.

Dann gilt nach MICHAELIS

$$\frac{[S] \cdot (\Sigma - \sigma - \sigma)}{\sigma} = K_S \qquad \text{und} \qquad \frac{H^+ \cdot \sigma}{\sigma} = 2 \cdot 10^{-7}.$$

Der Zahlenwert von K_S sei 0,03, die Wasserstoffionenkonzentration betrage $2 \cdot 10^{-7}$, so daß $\sigma = \sigma$ ist. Nun tragen wir die gleiche Enzymmenge Σ einmal in 0,03n-, das andere Mal in 0,21n-Rohrzuckerlösung ein.

---

[2] H. V. EULER und K. MYRBÄCK, Diese Zs. Bd. 120, S. 61 [1922], und zwar S. 62.

In der 0,03n-Lösung muß neben dem freien Enzym ($\sum - \sigma - \bar{\sigma}$) gleichviel undissoziierte zerfallende Saccharase-Saccharose-Verbindung und neben der letzteren wieder gleichviel $\bar{\sigma}$ vorhanden sein. Wir müssen $^1/_3$ der bei der gewählten Temperatur maximal möglichen Reaktionsgeschwindigkeit [47] erhalten. In der 0,21n-Lösung muß neben dem freien Enzym 7mal mehr σ und auch 7mal mehr $\bar{\sigma}$ enthalten sein. Die Anfangsgeschwindigkeit, die wir messen, beträgt $^7/_{15}$ = 46,7% derjenigen, die wir bei optimaler h und Substratkonzentration erzielen können.

Tabelle 4.
Invertin *d*, Zeitwert = 0,26.
(Inversion bei 29,97 ± 0,03°. Polarisation bei 22°. p_H = 4,4—4,6. K_S = 0,040.)

a_0 [S]	- log [S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (10 Min.)	100 ρ ber.	100 ρ gef.	Δ
5,028	0,86	12,0	4,74	0,288	23	77,5	77	— 0,5
(0,138)		26,5	4,43	0,598				
		47,5	3,995	1,05				
2,54	1,16	14,1	2,285	0,255	19	63,5	63,5	± 0,0
(0,070)		29,5	1,97	0,57				
		43,2	1,76	0,78				
2,042	1,26	14,6	1,795	0,247	17,5	58,5	58,5	± 0,0
(0,056)		34,3	1,44	0,602				
		52,1	1,195	0,847				
0,98	1,57	13,0	0,835	0,145	11,5	40,5	38,5	— 2,0
(0,027)		33,7	0,63	0,35				
		54,2	0,455	0,525				
0,51	1,85	16,5	0,385	0,125	8	26	27	+ 1,0
(0,014)		31,8	0,295	0,215				
		54,0	0,185	0,325				
0,345	2,02	14,7	0,260	0,085	6	19	20	+ 1,0
(0,0095)		34,1	0,185	0,16				
		56,7	0,145	0,20				

Wir wiederholen den Versuch bei $p_H = 4,7$ und finden in der 0,03n-Lösung 50%, in 0,21n-Lösung 87,5% der für unendlich große Substratkonzentration extrapolierten Anfangsgeschwindigkeit. Beim Übergang von der 0,03n- zur 0,21n-Rohrzuckerlösung müßte demnach der molare Umsatz bei $p_H = 4,7$ auf das $^7/_4$fache, bei $p_H = 6,7$ dagegen nur auf das $^7/_5$fache steigen, also um 75 bzw. 40%. Die Affinitätskonstante wäre in der Nähe des Neutralpunktes doppelt so [48] groß als bei optimaler Wasserstoffzahl, die Aktivitäts-log[S]-Kurve wäre um 0,3 Abszisseneinheiten nach links verschoben.

Die in Tab. 4 und 5 mitgeteilten Versuche widersprechen dieser Folgerung der Theorie von MICHAELIS und ROTHSTEIN. Mit einem der reinsten Invertinpräparate (*d* des Abschn. 2) haben wir die Abhängigkeit der Saccharasewirkung von der Rohrzuckerkonzentration bei $p_H = 4,4$ und 6,79 gemessen.

Unabhängig von der Acidität finden wir in genauer Übereinstimmung jedesmal in 0,040n-Saccharoselösung 50% der maximal möglichen Inversionsgeschwindigkeit.

Tabelle 5.
Invertin *d*, $2^1/_2$mal soviel Enzym wie in Tab. 4.
(Puffer: $^m/_{75}$ Standardphosphat. Inversion bei 30,02 ± 0,02°, Polarisation bei 23°.
p_H = 6,79. K = 0,040.)

α_0 [S]	− log [S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (10 Min.)	100 ρ ber.	100 ρ gef.	Δ
4,89	0,87	26,3	4,41	0,48	18	77	80	+ 3,0
(0,134)		40,5	4,15	0,74				
		55,0	3,95	0,94				
2,40	1,18	17,0	2,17	0,23	14	62	62	± 0,0
(0,066)		34,0	1,95	0,45				
		49,7	1,75	0,65				
1,51	1,38	17,3	1,31	0,20	11,5	51	51	± 0,0
(0,0415)		35,1	1,12	0,39				
		50,0	0,975	0,535				
0,917	1,60	16,0	0,78	0,137	9	39	40	+ 1,0
(0,0252)		33,8	0,64	0,277				
		48,7	0,55	0,367				
0,465	1,89	14,8	0,38	0,085	5,5	42	24	± 0,0
(0,0128)		30,5	0,31	0,155				
		46,0	0,215	0,25				
0,267	2,13	18,7	0,185	0,072	3,5	15,5	15,5	+ 0,0
(0,0073)		32,8	0,15	0,117				
		48,5	0,100	0,167				

Ohne Hilfshypothese über Natur und Koexistenz der [49] Gleichgewichte muß aber auch die Aktivitäts-p_H-Kurve bei Wechsel der Rohrzuckerkonzentration ihre Lage ändern.

Die eben angestellten Überlegungen fordern, daß in 0,03n-Lösung bei einer $[H^{\cdot}] = 2 \cdot 10^{-7}$ 66,7%, in 0,21n-Lösung dagegen 53,4% der bei derselben [S] und bei $p_H = 4,7$ erreichbaren Umsatzgeschwindigkeit meßbar sind, wenn wir den Parameter der Aktivitätskurve als Dissoziationskonstante der Saccharase-Saccharose-Säure deuten. Das ist jedoch nicht der Fall.

Die Theorie der elektrolytischen Dissoziation der Fermente vermag auch in ihrer durch Michaelis und Rothstein modifizierten Fassung den Tatsachen der Invertinwirkung nicht gerecht zu werden. Indem wir das Wesentliche der Vorstellungen von L. Michaelis und von H. v. Euler übernehmen und miteinander vereinen, könnten wir durch gleichzeitige Änderung von Gleichgewicht und Reaktionsfähigkeit die Beobachtungen verstehen. Aber wir glauben nicht, daß man das einfache Bild, das die Versuche liefern, durch zufällige Kompensation in einem verwickelten Mechanismus erklären soll.

Wir schließen: Das Gleichgewicht zwischen Enzym und Zucker ist unabhängig von der Wasserstoffzahl. Die Wasserstoffionen bestimmen die Zerfallsgeschwindigkeit des Saccharase-Saccharose-Komplexes.

5. Das Invertin verschiedener Hefen.

Es ist auffallend, daß die lediglich aus verschiedenen Hefelieferungen der Löwenbrauerei dargestellten Invertinlösungen, mit denen in den zwei letzten Abschnitten

die Versuche über Invarianz der Aktivitätskurve bei Änderung des Reinheitsgrades und der h ausgeführt wurden, nicht unerheblich differierende Werte für K_S geliefert haben, nämlich 0,029 und 0,040. Den letzteren Wert finden wir an dem aus Neutralautolysat gewonnenen Präparat e (l der III. Mitteilung über Invertin) bestätigt. Der logarithmische Parameter —1,40 (Abb. 6b) entspricht der niedersten bisher an Hefesaccharase gemessenen Affinitätskonstante zum Rohrzucker, nämlich 25.

[50] Tabelle 6.
Invertin e, Zeitwert = 0,37.
(Inversion bei 30,03 ± 0,02°, Polarisation bei 18,5°. K_S = 0,040.)

α_0[S]	-log [S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (12,5 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
4,89 (0,1345)	0,87	15,7 33,0 50,5	4,365 3,75 3,31	0,525 1,14 1,58	41	77	77	± 0,0
2,45 (0,0673)	1,17	22,6 34,3 54,0	1,83 1,52 1,065	0,62 0,93 1,385	33	62,5	62	— 0,5
1,095 (0,0301)	1,52	19,2 41,7 63,4	0,73 0,34 0,07	0,365 0,755 1,025	23	43	43	± 0,0
0,310 (0,0085)	2,07	21,5 42,2 61,0	0,150 0,04 —0,035	0,16 0,27 0,345	9,5	17,5	18	+ 0,5

Tabelle 7.
Saccharasewirkung des amerikanischen Invertins.
(Inversion bei 30,00 ± 0,03°, Polarisation bei 22°. K_S = 0,020.)

α_0[S]	-log [S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (10 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
5,295 (0,1455)	0,84	9,5 20,3 29,7	5,01 4,665 4,383	0,285 0,630 0,912	30,5	88	88	± 0,0
3,51 (0,0965)	1,02	9,0 18,7 30,2	3,26 2,955 2,65	0,250 0,555 0,86	28,5	83	82	— 1,0
1,79 (0,0492)	1,31	12,2 24,0 37,1	1,49 1,20 0,88	0,30 0,59 0,91	24,5	71	71	± 0,0
1,035 (0,0286)	1,54	13,5 27,5 40,7	0,75 0,46 0,31	0,285 0,565 0,725	20,5	59	59	± 0,0
0,718 (0,0197)	1,71	9,6 20,8 32,7	0,557 0,373 0,270	0,160 0,345 0,448	17,5	49,5	50,5	+ 1,0
0,180 (0,0050)	2,31	12,5 28,8	0,100 0,045	0,080 0,153	6,5	20	19	— 1,0

[51] Gerade doppelt so groß ist die Affinität des unter g) beschriebenen amerikanischen Invertins (Tab. 7, Abb. 7a und 7b) und alle aus Brauereihefe dargestellten

Tabelle 8.
Saccharasewirkung des dänischen Invertins.
(Inversion bei 29,90 ± 0,05°, Polarisation bei 20°. K_S = 0,017.)

$\alpha_0[S]$	$-\log[S]$	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (10 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	f
7,16 (0,197)	0,71	16,1	6,815	0,345	21,5	92	91	— 1,0
		28,5	6,54	0,62				
		44,5	6,17	0,99				
5,047 (0,138)	0,86	17,2	4,69	0,357	21	89	89	± 0,0
		31,3	4,375	0,672				
		43,8	4,12	0,927				
2,47 (0,0678)	1,17	16,6	2,155	0,315	19	80	80,5	+ 0,5
		29,5	1,895	0,575				
		43,7	1,70	0,77				
1,518 (0,0417)	1,38	14,1	1,290	0,23	16,5	71	70	— 1,0
		28,5	1,063	0,445				
		43,6	0,843	0,675				
0,988 (0,0272)	1,57	16,3	0,76	0,228	14,5	61,5	61,5	± 0,0
		32,1	0,55	0,438				
		41,5	0,425	0,563				
0,530 (0,0145)	1,84	14,0	0,38	0,15	11	46	47	+ 1,0
		28,6	0,23	0,30				
		46,7	0,12	0,41				
0,355 (0,0098)	2,01	13,7	0,245	0,110	8,5	36,5	36	— 0,5
		26,5	0,150	0,205				
		40,7	0,073	0,282				
0,297 (0,0082)	2,09	10,0	0,227	0,070	7	32,5	29,5	— 3,0
		30,7	0,145	0,152				
		45,5	0,105	0,192				

Tabelle 9.
Invertin der Rasse II.
(Inversion bei 30,04 ± 0,03°, Polarisation bei 20—21°. K_S = 0,016.)

$\alpha_0[S]$	$-\log[S]$	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (15 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	f
5,355 (0,147)	0,83	16,0	5,03	0,325	31	90,5	89,5	— 1,0
		37,0	4,57	0,785				
		49,3	4,30	1,055				
3,55 (0,0976)	1,01	20,3	3,155	0,395	30	86	87	+ 1,0
		36,0	2,81	0,74				
		51,2	2,495	1,055				
1,80 (0,0495)	1,31	18,1	1,48	0,32	26,5	75,5	76,5	+ 1,0
		34,5	1,22	0,58				
		46,5	1,035	0,765				
1,11 (0,0305)	1,52	15,5	0,88	0,230	22,5	65,5	65,5	± 0,0
		35,0	0,615	0,495				
		47,8	0,47	0,64				
0,632 (0,0174)	1,76	17,0	0,44	0,19	17,5	52	50,5	— 1,5
		30,5	0,30	0,33				
		43,5	0,19	0,44				
0,220 (0,0061)	2,22	18,0	0,115	0,105	10	27,5	29	+ 1,5
		33,7	0,065	0,155				
		52,0	0,030	0,19				

Lösungen und Präparate werden in dieser Hinsicht durch das Invertin der Brennereihefen übertroffen. In naher Übereinstimmung mit dem von L. Michaelis und M. L. Menten[1] bei 25° ermittelten [52] Wert für die Dissoziationskonstante der Saccharase-Saccharose-Verbindung 0,016 fanden wir mit den unter f), h) und i) im Abschnitt 2 näher charakterisierten Auszügen aus dänischer Hefe sowie aus den Heferassen II und XII bei 30° K_S = 0,017, 0,016 und 0,016 (vgl. die Tab. 8, 9 und 10 mit den zugehörigen Abbildungen).

Wir möchten hervorheben, daß die Affinitätsbestimmung sich nicht zur Charakterisierung verschiedener Hefen verwerten läßt, wenn auch gewisse Eigentümlichkeiten, wie der Unterschied zwischen Brauerei- und Brennereihefen, auch in der Affinität des Invertins zum Rohrzucker zum Ausdruck zu kommen scheint. Die Schwankungen der K_S-Werte, die sich beim [53] Vergleich der Saccharasewirkung der aus verschiedenen Lieferungen derselben Hefe dargestellten Invertinlösungen und -präparate ergeben, sind nicht nur bei der dem technischen Betrieb entnommenen Hefe der Löwenbrauerei beobachtet worden. Wie im folgenden Kapitel (Abschn. 4) gezeigt wird, ist dies auch für verschiedene Aufzüchtungen der Reinkulturhefe Rasse XII der Fall.

Tabelle 10.
Invertin der Rasse XII.
(Inversion bei 30,05 ± 0,03°, Polarisation bei 21°. K_S = 0,016.)

c_0[S]	−log[S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (12,5 Min.)	100 ρ ber.	100 ρ gef.	Δ
7,415	0,69	13,5	7,195	0,22	20,5	92,5	91,5	− 1,0
(0,2037)		27,0	7,00	0,415				
		46,2	6,74	0,675				
3,618	1,00	14,0	3,395	0,222	20	86	89,5	+ 3,5
(0,0995)		31,3	3,135	0,483				
		50,3	2,89	0,726				
1,815	1,30	15,2	1,61	0,205	17	76	76	± 0,0
(0,0498)		33,8	1,375	0,44				
		50,0	1,175	0,64				
1,071	1,53	13,0	0,93	0,14	13,5	64,5	60,5	− 4,0
(0,0295)		26,2	0,82	0,25				
		45,7	0,655	0,415				
0,747	1,69	13,9	0,607	0,14	12,5	56	56	± 0,0
(0,0205)		29,8	0,490	0,257				
		42,3	0,41	0,337				
0,370	1,99	14,7	0,270	0,100	9	39	40	+ 1,0
(0,0102)		28,1	0,225	0,145				

Der Tatsache von der Unabhängigkeit der Aktivitätskurve vom Reinheitsgrad steht die wechselnde Affinität des Invertins verschiedener Herkunft zum Rohrzucker gegenüber. Darum müssen wir den Grund hierfür entweder in einer Verschiedenheit des Invertins von Hefe zu Hefe oder aber in der Beimischung [54] wechselnder Mengen

[1] Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913].

eines oder mehrerer dem Enzym selbst nahestehender Körper suchen, die, wie sie in der Natur gebildet wurden, das Invertin durch alle Reinigungsoperationen begleiten und die mit seinen wirksamen Gruppen in Wechselwirkung stehen. Was die erste Möglichkeit betrifft, so muß daran erinnert werden, daß die von R. MARC [1] ausgeführten Versuche über Adsorption löslicher Stärke an Bariumsulfat ein ähnliches Bild zeigen: Bei Alterung der Stärkelösungen bleiben die Adsorptionskurven affin, sie sind aber für verschiedene Stärkelösungen verschieden.

Wir schließen aus den Beobachtungen, von denen der 6. Abschnitt berichten wird, daß die Affinitätsunterschiede nicht durch derartige Verschiedenheiten der kolloiden Natur oder der reaktionsfähigen chemischen Gruppen des Invertins zu erklären sind, sondern, daß sie im wechselnden Mengenverhältnis von Körpern, die dem Enzym in konstitutioneller Hinsicht verwandt sein müssen, ihren Grund haben. Nach dieser Auffassung kommt dem Enzym selbst eine charakteristische und konstante Affinität zu seinem Substrat zu, deren numerischer Wert vorerst freilich noch unbekannt ist.

6. Wirkung arteigener und artfremder Kochsäfte.

Der Frage, ob die in einer Saccharaselösung enthaltenen Verunreinigungen das Enzym zu binden vermögen, haben schon H. v. EULER und J. LAURIN [2] ein Experiment gewidmet. Eine gereinigte Saccharaselösung aus schwedischer Brauereihefe ($K_S = 0{,}029$) wurde unter Zusatz der doppelten Menge derselben Lösung, die zuvor durch Erhitzen ihrer enzymatischen Kraft beraubt wurde, geprüft. Eine Änderung der Affinität wurde nicht beobachtet.

Wir haben ähnliche Versuche in Angriff genommen und glauben schon hier darüber berichten zu müssen, da wir durch sie über die Ursachen der wechselnden Affinität der Saccharase [55] zur Saccharose unterrichtet werden, wenn sie auch die Frage nach dem Mechanismus der Affinitätsänderungen noch nicht restlos beantworten.

Beruht die wechselnde Affinität auf der verschiedenen Kolloidnatur, die dem Enzym bei seiner Loslösung vom Protoplasma, bei seiner mechanischen oder enzymatischen Freilegung [1]) in jedem Falle gerade eigen ist und eigen bleibt, und wird dieser Zustand durch Erhitzen zerstört, so kann, da ja alle analytisch nachweisbaren Verunreinigungen für die Änderung der Affinität nicht in Betracht kommen, die Wirksamkeit des Invertins durch einen Kochsaft nicht beeinflußt werden.

Das ist auch nicht denkbar, wenn sich die Invertine von differierender Rohrzuckeraffinität durch die Konstitution der chemisch wirksamen Gruppen unterscheiden. Tatsächlich gelingt es aber, die Affinität gewisser Saccharasen durch Zusatz von Kochsäften zu ändern.

---

[1] Zs. physikal. Chem. Bd. 81, S. 641 [1912/13], und zwar S. 656, und W. MECKLENBURG, a. a. O., S. 623.

[2] A. a. O., S. 87.

[1]) R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Ann. d. Chem. Bd. 427, S. 111 [1921/22].

Die verwendeten Kochsäfte waren durch 15 Minuten langes Erhitzen der betreffenden Invertinlösungen über freier Flamme gewonnen, von koagulierten Proteinen durch Filtration befreit und auf Unwirksamkeit geprüft. Immer wurde so viel Saft verwendet, daß der M.Z.Q.[2] vor dem Erhitzen das 10fache von dem im späteren Versuch wirksamen betrug. Gemischt wurde der Kochsaft mit der pufferhaltigen Zuckerlösung, so daß das Enzym gleichzeitig auf beide traf.

Tab. 11 zeigt, daß die Saccharoseaffinität des Invertins *b* (K_S = 0,029, vgl. Tab. 2) trotz des großen Überschusses an Kochsaft, der durch Erhitzen des Neutralautolysats der dänischen Brennereihefe gewonnen wurde, ungeändert bleibt. Der artfremde Kochsaft, in dem das Invertin höhere Affinität zum Rohrzucker besaß (K_S = 0,017, vgl. Tab. 8), ist also ohne Einfluß.

Der umgekehrte Versuch, die Affinitätsbestimmung eines Invertins von hoher Affinität unter Zusatz eines Kochsaftes, in dem die Saccharase vor dem Erhitzen eine nur halb so [56] große Affinität zum Zucker aufgewiesen hatte, wurde mit dem Autolysat der Rasse XII (*i* des 2. Abschnittes, K_S = 0,016) und dem der Löwenbräuhefe (*a* des Abschnittes 2, K_S = 0,029) ausgeführt. Der Vergleich der Abb. 10b und 12b ergibt, daß sich die Aktivitäts-—log[S]-Kurve um 0,28 Abszisseneinheiten nach rechts verschoben hat. Die Affinitätskonstante ist von 62,5 auf 33 gefallen und stimmt innerhalb der Versuchsfehler mit derjenigen des Löwenbräuinvertins 34,5 überein.

Tabelle 11.
Invertin aus Löwenbräuhefe mit dänischem Kochsaft.
(Inversion bei 29,85 ± 0,05°, Polarisation bei 20°. K_S = 0,029.)

α_0[S]	−log[S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anfangs-Geschw. (15 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
3,565	1,01	16,0	3,375	0,19	19	77	77	± 0,0
(0,098)		26,0	3,24	0,325				
		48,5	2,945	0,62				
2,495	1,16	16,5	2,305	0,19	17	70,5	69	— 1,5
(0,0687)		30,0	2,17	0,325				
		47,8	1,94	0,555				
1,48	1,39	17,0	1,30	0,18	15	58,5	61	+ 2,5
(0,0407)		34,7	1,135	0,345				
		50,0	0,97	0,51				
0,720	1,70	15,9	0,615	0,105	10	40,5	40,5	± 0,0
(0,0198)		31,7	0,51	0,21				
		44,8	0,435	0,285				
0,310	2,07	16,1	0,255	0,055	5,5	22,5	22	— 0,5
(0,0085)		26,5	0,24	0,07				

Während nun arteigener Kochsaft die Saccharase von niederer Affinität (Autolysat *a*, K_S = 0,029) in Ergänzung des Befundes von H. v. EULER und J. LAURIN selbst bei 10fachem Überschuß nicht meßbar zu binden vermag (Verhältnis der In-

[2] M.Z.Q. = Menge-Zeit-Quotient. Vgl. R. WILLSTÄTTER und F. RACKE, Ann. d. Chem. Bd. 425, S. 1 [1920/21], und zwar S. 8.

versionsgeschwindigkeiten in 0,138 n- und 0,0138 n-Lösung = 9:22, mit Kochsaft = 9:22,5), wird der Parameter der Saccharasewirkung des dänischen Invertins 0,017 [57] nach Tab. 13 durch den arteigenen Kochsaft auf 0,030 erhöht.

Tabelle 12.
Invertin der Rasse XII mit Löwenbräukochsaft.
(Inversion bei 29,95 ± 0,03°. Polarisation bei 21°. K_S = 0,030.)

α_0 [S]	-log [S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-Geschw. (10 Min.)	100 y ber.	100 y gef.	Δ
4,945 (0,136)	0,87	14,0	4,695	0,250	18	82	82,5	+ 0,5
		31,8	4,41	0,535				
		49,3	4,17	0,775				
2,425 (0,068)	1,17	13,2	2,215	0,21	15	60,5	60	− 0,5
		26,3	2,025	0,40				
		46,5	1,80	0,625				
1,495 (0,0411)	1,39	14,7	1,300	0,195	13	58	59,5	+ 1,5
		29,5	1,145	0,35				
		46,8	0,938	0,557				
0,992 (0,0272)	1,57	15,8	0,83	0,162	10	47,5	46	− 1,5
		31,3	0,715	0,277				
		51,0	0,55	0,442				
0,493 (0,0135)	1,87	17,8	0,378	0,115	7	31	32	+ 1,0
		33,0	0,300	0,193				
		54,3	0,225	0,268				
0,280 (0,0077)	2,11	20,3	0,220	0,060	4	20,5	18,5	− 2,0
		37,7	0,190	0,09				

Wie die folgende kleine Zusammenstellung zeigt, führen die bisher gemessenen Affinitätsverringerungen des Invertins übereinstimmend zum Werte K_S = 0,029 ± 0,002, der selbst weder durch arteigenen noch durch artfremden Kochsaft geändert wird.

In der obersten Horizontalreihe sind die K_S-Werte derjenigen Invertinlösungen angegeben, aus denen die Kochsäfte bereitet wurden, in der ersten Vertikalreihe die ohne Kochsaft bestimmten Werte für die wirksame Saccharase:

	0,029	0,016
0,029	0,029	0,029
0,017	0,030	—
0,016		0,030

[58] Es hat den Anschein, als ob es ein besonders begünstigtes Invertin gäbe, dem die Affinitätskonstante 34 ± 2 gegenüber dem Rohrzucker zukommt. Man könnte diese Tatsache durch die Annahme erklären, daß den kochbeständigen Bestandteilen der Saccharaselösung eine hohe Affinität zum Enzym zukommt, daß aber auch die gebundene Saccharase enzymatisch wirksam ist.

In einer Invertinlösung von K_S = 0,03 müßte diese Stufe bereits dissoziationsfrei vorliegen.

Tabelle 13.
Dänisches Invertin mit dänischem Kochsaft.
(Inversion bei 29,88 ± 0,03°, Polarisation bei 22°. K_S = 0,030.)

x_0 [S]	-log [S]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-Geschw. (10 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
5,015	0,86	11,3	4,75	0,265	23,5	82	82	± 0,0
(0,1377)		25,1	4,435	0,58				
		44,0	4,025	0,99				
2,017	1,26	12,3	1,79	0,227	18,5	65	65	± 0,0
(0,0554)		22,6	1,585	0,432				
		36,3	1,32	0,697				
1,018	1,55	13,5	0,83	0,188	14	48	49	+ 1,0
(0,028)		27,5	0,67	0,348				
		41,0	0,505	0,513				
0,515	1,85	12,3	0,41	0,105	0	32	31,5	— 0,5
(0,0142)		27,7	0,33	0,185				
		44,2	0,245	0,27				

Versuche mit wechselnder Saftkonzentration und mit Invertin von noch geringerer Affinität (K_S = 0,04) müssen zeigen, ob diese Auffassung berechtigt ist oder nicht.

Die Frage, ob neben dem freien Invertin (K_S = 0,016) auch das gebundene Rohrzucker zu spalten vermag, scheint auch durch exakten Vergleich der H-Ionenwirkung auf verschiedene Invertine prüfbar. Ist nur die freie Saccharase wirksam, so muß der Parameter der Aktivitäts-p_H-Kurve unabhängig von dem der Aktivitäts-pS-Kurve sein. Aber es [59] übersteigt vielleicht die Differenz zwischen den von L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN[1] einerseits, von L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN[2] und uns[3] andererseits bestimmten Zahlen die Fehlergrenzen einer exakten Methodik.

Unabhängig von diesen hypothetischen Vorstellungen über die Struktur der wirksamen Gruppen erweist sich die Konstanz der Invertinwirkung als Spezialfall für das Invertin der Löwenbräuhefe (allgemein für K_S = 0,029). Bei höherer Affinität kann sie nicht zutreffen, da hier durch zunehmenden Gehalt an Zersetzungsprodukten die Affinität zum Rohrzucker erniedrigt werden muß, wofern das Bindungsvermögen der Säfte nicht erst durch Kochen zustande kommt.

Wir werden im folgenden Kapitel die Affinitätsdifferenzen durch Annahme wechselnder Mengen eines Hemmungskörpers deuten, der durch seine Affinität zu den aktiven Gruppen des Enzyms diese in eine unwirksame Stufe überführt.

Die Genauigkeit der Affinitätsmessung der Raffinase zur Raffinose (III. Kap., Abschn. 2) sowie die Genauigkeit der aus den Anfangsgeschwindigkeiten der Rohrzucker- und Raffinosehydrolyse gebildeten Quotienten (III. Kap., Abschn. 3) gestattet nämlich nicht, zwischen Wirksamkeit oder Unwirksamkeit des gebundenen Invertins zu entscheiden. Für das Verständnis der Kochsaftwirkungen scheint jedoch nur folgende Erklärung möglich:

---

1 A. a. O.
2 Biochem. Zs. Bd. 35, S. 386 [1911].
3 R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922].

Die differierenden Affinitäten des Invertins zum Rohrzucker sind bedingt durch Assoziation des kolloiden Trägers mit unwirksamen, dem Enzym in chemischer Hinsicht nahestehenden Körpern. Diese Assoziationen bleiben für die wirksamen Gruppen nicht unbemerkt. Die analytisch bestimmbare Konzentration des Rohrzuckers in der Lösung steht dadurch zu derjenigen, die an den reaktionsfähigen Gruppen herrscht, in einem für die Hydrolyse ungünstigeren Verhältnis als ohne Kochsaft. Darum finden wir die Aktivitäts-*p*S-Kurve nach [60] rechts verschoben. Ist die Oberfläche des kolloiden Trägers mit einem derartigen Körper gesättigt, so kann weiterer Zusatz des Kochsaftes die Affinität nicht mehr verringern.

III. Die Affinität des Invertins zur Raffinose.

Da nach den Ergebnissen des II. Kapitels das Invertin verschiedener Hefen für die Rohrzuckerspaltung in ungleichem Maße geeignet ist, so scheint es nicht wunderlich, daß der Quotient Raffinasezeitwert : Saccharasezeitwert mit verschiedenem Enzymmaterial verschieden ausfällt. Wir untersuchen daher in diesem Kapitel, ob den verschiedenen Affinitäten der Saccharase zur Saccharose auch verschiedene Affinitäten der Raffinase zur Raffinose entsprechen und ob zwischen diesen Größen ein gesetzmäßiger Zusammenhang besteht.

1. Das untersuchte Konzentrationsgebiet.

Das Galaktosid des Rohrzuckers[1] wird vom Invertin der gewöhnlichen Kulturhefen langsamer als seine Muttersubstanz gespalten, und die Umsatzgeschwindigkeit nimmt noch in so konzentrierten Lösungen des Trisaccharids stark zu, wo die maximale Geschwindigkeit der Rohrzuckerhydrolyse fast erreicht ist, daß die Affinität der Raffinase zur Raffinose jedenfalls viel geringer ist als die der Saccharase zur Saccharose.

Auch das höhere Molekulargewicht und die geringere Löslichkeit sind für die Affinitätsmessung nicht günstig.

Wenn in 0,2 n-Saccharoselösungen durch Veränderung der Natur des Lösungsmittels[2] Abweichungen vom Massenwirkungsgesetz zu beginnen scheinen, so ist das in Raffinoselösungen schon bei geringerer Konzentration zu erwarten. Aus diesem Grunde ist es nicht möglich, daß die experimentell bestimmbare maximale Reaktionsgeschwindigkeit der dissoziationsfreien Bindung des Enzyms an den Zucker entspricht. Sie wird [61] vielmehr eintreten, wenn die durch Viscositätserhöhung, Änderung des osmotischen Aktivitätskoeffizienten usw. bedingten Erscheinungen die Konzentrationszunahme der Raffinase-Raffinose-Verbindung verhindern bzw. nach außen hin nicht mehr erkennen lassen. Man erhält in der Tat keine Dissoziationsrestkurve, wenn man die Anfangsgeschwindigkeiten der Raffinosespaltung als Funktion von $\log \frac{1}{[R]}$ aufträgt und die Maximalgeschwindigkeit als Maßstab der Ordinate wählt.

[1] Über die von der Direktion der Zuckerraffinerie Hildesheim in freundlichster Weise überlassene Raffinose vgl. diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921], und zwar S. 185.

[2] L. MICHAELIS und M. L. MENTEN, Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1914], und zwar S. 349.

Beurteilt man jedoch die Neigung der Kurve, die die experimentell gefundenen Punkte verbindet, so lassen sich alle Versuche bis zu etwa 10proz. Lösungen des Trisaccharids durch Dissoziationskurven darstellen. Da jedoch hier erst $^1/_3$ bis $^1/_2$ der theoretischen Maximalgeschwindigkeit erreicht wird, kann man die Affinität der Raffinase zur Raffinose nicht mit besonderer Genauigkeit ermitteln. Ziemlich willkürlich und dabei von nicht geringem Einfluß auf das Resultat ist es namentlich, welches Gewicht man den größten beobachteten Umsatzgeschwindigkeiten beimißt. Es zeigt sich nämlich, daß z. B. einmal (vgl. Tab. 16, S. 64) die Geschwindigkeit beim Übergang von 0,1- zu 0,2n-Lösung von 17 auf 25, ein andermal (Tab. 15, S. 63, Spalte 6) dagegen nur von 22 auf 25 steigt, obwohl wir aus den in verdünnteren Lösungen angestellten Versuchen eine sehr nahe übereinstimmende Affinität berechnen. Es scheint, daß die Anomalien in konzentrierten Lösungen nicht allein durch die Beschaffenheit

[62]

Tabelle 14.

Raffinasewirkung des Invertins Rasse II.

(8mal mehr Enzym als in Tab. 9. Hydrolyse bei 30,05 ± 0,03°, Polarisation bei 20°. K_R = 0,24.)

a_0 [R]	$-\log[R]$	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (10 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
21,95 (0,222)	0,65	10,6	21,53	0,42	40,5	48,0	39,2	− 8,8
		20,1	21,14	0,81				
		36,8	20,49	1,46				
14,64 (0,148)	0,83	9,5	14,27	0,37	39,5	38,2	38,2	+ 0,0
		18,5	13,98	0,66				
		33,5	13,49	1,15				
10,955 (0,111)	0,96	11,2	10,59	0,365	33	31,6	32,0	+ 0,4
		21,3	10,385	0,57				
		38,2	10,125	0,83				
7,31 (0,074)	1,13	11,2	7,04	0,27	24,5	23,6	23,7	+ 0,1
		20,0	6,84	0,47				
		36,8	6,48	0,83				
4,33 (0,0438)	1,36	22,0	4,005	0,325	16	15,5	15,5	± 0,0
		33,5	3,865	0,465				
		54,5	3,625	0,705				
3,92 (0,0397)	1,40	10,0	3,770	0,15	15	14,2	14,5	+ 0,3
		33,4	3,48	0,44				
		50,5	3,34	0,58				
2,11 (0,0214)	1,67	10,2	2,015	0,095	8,5	8,2	8,2	± 0,0
		24,5	1,93	0,18				
		45,0	1,79	0,32				
1,45 (0,0147)	1,83	10,7	1,385	0,065	6	5,8	5,8	± 0,0
		20,0	1,33	0,12				
		45,4	1,21	0,24				
1,01 (0,0102)	1,99	10,0	0,950	0,060	6	4,1	5,8	+ 1,7
		21,2	0,897	0,113				
		48,5	0,770	0,24				
0,85 (0,0086)	2,07	13,0	0,810	0,040	3,5	3,5	3,9	+ 0,4
		24,7	0,797	0,063				
		49,3	0,753	0,097				

des Milieus erklärt werden können. (Über eine Anomalie der Kinetik, die indes auf Versuchsfehlern beruhen dürfte, vgl. Abb. 14a).

Immerhin glauben wir, daß die von uns berechneten K_R-Werte auf ± 30 bis 50% genau sind und daher nicht nur die Größenordnung der Affinität selbst, sondern auch die Richtung der Affinitätsänderungen richtig wiedergeben. Die äußeren Bedingungen, die zur Verfolgung der Raffinosehydrolyse einzuhalten sind[1], gleichen denen bei der Inversion des Rohrzuckers derart, daß wir bezüglich der Ausführung der folgenden Versuche auf das im II. Kapitel, Abschnitt 1 Gesagte verweisen. [63] Die Normalität der Raffinoselösungen wurde aus der für Versuchsbeginn extrapolierten Anfangsdrehung auf Grund der Beziehung $\alpha_0 : [R] = 13{,}71 : 0{,}1387$ berechnet.

2. Raffinosespaltung durch verschiedene Invertine.

Das Invertin der Rasse II und das der Rasse XII stimmen nicht nur in bezug auf die Aktivitätskurve der Saccharasewirkung mit einander überein. Auch die Abhängigkeit der Raffinosespaltung vom log der reziproken $[R]$ läßt sich, wie die Abb. 14b und 15b zeigen, für beide am besten durch den nämlichen Parameter $-\log[R] = 0{,}62$

Tabelle 15.
Raffinasewirkung des Invertins Rasse XII.
(6,67mal mehr Enzym als in Tabelle 10. Hydrolyse bei 29,85 ± 0,03°, Polarisation bei 20°. $K_R = 0{,}24$.)

α_0 $[R]$	$-\log [R]$	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Auf.-Geschw. (10 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
20,745	0,68	9,5	20,515	0,23	24,5	46,7	37,3	− 9,4
(0,21)		19,8	20,27	0,475				
		33,8	19,985	0,76				
11,917	0,92	12,8	11,645	0,272	22	33,5	33,5	± 0,0
(0,121)		24,7	11,43	0,487				
		38,3	11,19	0,727				
5,925	1,22	10,7	5,785	0,14	13	20,0	19,8	− 0,2
(0,060)		27,3	5,63	0,295				
2,96	1,52	14,8	2,86	0,10	7,5	11,1	11,4	+ 0,3
(0,030)		25,0	2,79	0,17				
		46,2	2,705	0,255				
1,485	1,82	12,5	1,435	0,05	4	5,9	6,1	+ 0,2
(0,015)		28,6	1,405	0,08				
		48,6	1,355	0,13				
0,712	2,14	13,8	0,685	0,027	2	2,9	3,0	+ 0,1
(0,0072)		25,5	0,670	0,042				
		39,0	0,662	0,050				

darstellen, der die [64] beobachteten Werte bis zu $^1/_3$ des theoretisch möglichen Umsatzes sehr genau wiedergibt.

Innerhalb der Fehlergrenzen stimmt auch die Raffinasewirkung des dänischen Invertins (Tab. 16) mit derjenigen der Berliner Brennereihefen überein, wobei selbst

[1] R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921], und zwar S. 185ff.

Tabelle 16.
Raffinasewirkung des dänischen Invertins.
(Hydrolyse bei 30,04 ± 0,03°, Polarisation bei 23°. K_R = 0,27.)

a_0 [R]	-log [R]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (10 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
30,11	0,52	12,3	29,72	0,39	31,5	53,0	53,0	± 0,0
(0,304)		20,0	29,50	0,61				
		32,0	29,11	1,00				
20,00	0,69	12,5	19,685	0,315	25,5	42,8	42,8	± 0,0
(0,202)		22,5	19,445	0,555				
		34,5	19,16	0,84				
10,04	0,99	15,0	9,78	0,26	17	27,4	28,6	+ 1,2
(0,102)		32,5	9,56	0,48				
		50,0	9,41	0,63				
5,310	1,27	14,0	5,178	0,132	9,5	16,5	16,0	— 0,5
(0,0536)		26,1	5,12	0,190				
		49,5	4,995	0,315				
1,710	1,76	14,6	1,67	0,04	3,5	6,0	5,9	— 0,1
(0,0173)		26,5	1,635	0,075				
		45,7	1,58	0,13				

der in 0,3n-Lösung beobachtete Wert durch den logarithmischen Parameter 0,57 (Abb. 16b) gut wiedergegeben wird. Dagegen ist die Raffinoseaffinität des Löwenbräu-invertins *e* (Präparat *l* der III. Mitteilung über Invertin) entschieden geringer. Wir halten sogar den in Tab. 17 mitgeteilten Wert K_R = 0,66 noch für etwas zu klein, die Affinitätskonstante 1,5 demnach für zu groß, weil die in $^n/_4$-Lösung gefundene Geschwindigkeit die aus den anderen Versuchen für diese Konzentration berechnete ein wenig übertrifft.

Wir haben nämlich, um keine weitere Unsicherheit in die [65] Zahlen zu bringen,

Tabelle 17.
Raffinasewirkung des Invertins *e*, Zeitwert = 0,37.
(Hydrolyse bei 29,85 ± 0,03°, Polarisation bei 19°. K_R = 0,66.)

a_0 [R]	log [R]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anf.-Geschw. (16,7 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
25,13	0,59	14,1	24,63	0,50	58	27,8	29,0	+ 1,2
(0,254)		25,0	24,28	0,85				
		85,0	22,75	2,38				
10,055	0,99	17,3	9,795	0,26	26	13,4	13,0	— 0,4
(0,1018)		37,0	9,46	0,595				
		96,5	8,63	1,425				
4,918	1,30	16,2	4,785	0,132	13,5	7,0	6,7	— 0,3
(0,0498)		34,7	4,63	0,288				
		100,0	4,15	0,768				
2,005	1,69	17,3	1,95	0,055	5,5	3,0	2,7	— 0,3
(0,0203)		33,3	1,915	0,09				
		98,0	1,765	0,24				
1,005	1,99	23,3	0,955	0,050	4	1,5	2,0	+ 0,5
(0,0102)		44,5	0,905	0,100				

darauf verzichtet, für die mehr als 10proz. Lösungen eine Korrektur an den beobachteten Anfangsgeschwindigkeiten anzubringen, und haben den Parameter so gewählt, daß die Summe aller Fehlerquadrate möglichst gering wird.

3. Vergleich der Saccharase- und Raffinasewirkung.

Um zwischen relativer Spezifität des Invertins und absoluter Spezifität von Saccharase und Raffinase zu entscheiden, genügt es nun, nach der in der voranstehenden Abhandlung, Kapitel II unter 1 (S. 19), beschriebenen Methode, bei beliebiger Zuckerkonzentration die Hydrolysengeschwindigkeiten des Di- und Trisaccharids durch gleiche Enzymmengen zu messen, da die numerischen Werte der einzelnen Affinitäten K_S und K_R bekannt sind. Diesen Vergleich haben wir in 0,138n-Lösung ausgeführt, um mit dem früher[1] ermittelten [66] Zeitwertquotienten möglichst vergleichbare Zahlen zu erhalten. Berechnet wurde indes nicht die für 50proz. Umsatz jeweils nötige Zeit, sondern, um den Einfluß wechselnder Kinetik[1]) auszuschalten, das Verhältnis der für eine Versuchszeit von 10 Minuten graphisch interpolierten Drehungsabnahmen. Diese können direkt als Maß des relativen Umsatzes betrachtet werden, da in äquimolaren Lösungen der totalen Hydrolyse von Rohrzucker und Raffinose nahezu gleiche Drehungsabnahmen entsprechen. Die in Tab. 18 mitgeteilten Quotienten der Anfangsgeschwindigkeiten sind also mit der nämlichen Methodik gewonnen wie die Affinitätskonstanten, mit denen wir sie in Beziehung setzen werden. Sie weisen bei verschiedenem Invertinmaterial nicht so große Schwankungen auf wie die vor einem Jahr mitgeteilten Quotienten der Zeitwerte[2]). Ihre Extremwerte verhalten sich wie 1:1,7, während sie früher beim Invertin derselben Hefen das Verhältnis 1:2,4 erreichten. Das dürfte weniger darauf beruhen, daß seinerzeit die Bestimmungen mit der durch Toluol abgetöteten Hefe selbst, jetzt ausschließlich mit daraus gewonnenen Autolysaten und Präparaten ausgeführt wurden.

In weitaus den meisten Fällen dürften nämlich die von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[3]) sowie von R. WILLSTÄTTER und R. KUHN[4]) beobachteten Zunahmen der Reaktionsgeschwindigkeit bei Bestimmung von Maltase und α-Methylglucosidase oder von Saccharase und Raffinase in der Hefe nicht auf postmortale Neubildung von Enzym während des Versuchs zurückzuführen sein, sondern auf wechselnder Kinetik, die durch wechselnde Affinität des Enzyms zu Zucker und Glucosid sowie zu deren Spaltprodukten bedingt ist, beruhen.

Der Unterschied zwischen dem mit Invertinpräparaten der Löwenbräuhefe bestimmten Zeitwertquotienten 11,3 und dem Quotienten der Anfangsgeschwindigkeiten 8,0 bis 8,3 ist [68] hauptsächlich dadurch zu erklären, daß zur Berechnung des ersteren

[1] Diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921] (*Abh.* 75).

[1]) Vgl. ebenda Tab. 3, S. 189, und R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 63ff.

[2]) R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, a. a. O., S. 196.

[3]) Diese Zs. Bd. 115, S. 199 [1921], und zwar S. 204f. (*Abh.* 76).

[4]) A. a. O., S. 196f.

[67] Tabelle 18.

Geschwindigkeitsverhältnis der Rohrzucker- und Raffinosehydrolyse.
(0,138 n-Lösungen; Enzymmengen im Verhältnis 1 : 5.)

Nr.	Invertin aus	Wirkung auf	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Drehungsabnahme nach 10 Min. × 100	Quotient
c	Löwenbräuhefe Zeitwert = 0,64 Min.	Rohrz.	10,1	4,695	0,355	35	6,7
		,,	19,7	4,385	0,665		
		,,	30,0	4,07	0,98		
		Raffin.	9,7	13,455	0,255	26	
		,,	18,0	13,26	0,45		
		,,	32,3	13,04	0,67		
d	Löwenbräuhefe Zeitwert = 0,26 Min.	Rohrz.	11,0	4,77	0,28	24	8,0
		,,	22,8	4,54	0,51		
		,,	45,0	4,08	0,97		
		Raffin.	12,6	13,515	0,195	15	
		,,	28,5	13,33	0,38		
		,,	52,8	13,115	0,595		
e	Löwenbräuhefe Zeitwert = 0,37 Min.	Rohrz.	12,5	4,79	0,24	20	8,3
		,,	19,8	4,625	0,405		
		,,	35,0	4,34	0,69		
		Raffin.	12,3	13,56	0,15	12	
		,,	26,2	13,405	0,305		
		,,	42,3	13,255	0,455		
f	Kopenhagener Brennereihefe	Rohrz.	17,2	4,675	0,36	21	5,0
		,,	31,3	4,36	0,675		
		,,	43,8	4,105	0,93		
		Raffin.	13,8	13,395	0,285	21	
		,,	24,5	13,18	0,50		
		,,	35,3	12,95	0,73		
h	Rasse II	Rohrz.	12,5	4,795	0,255	30,5	4,8
		,,	22,4	4,58	0,47		
		,,	35,0	4,35	0,70		
		Raffin.	13,3	13,405	0,29	32	
		,,	25,5	13,155	0,54		
		,,	39,5	12,85	0,845		
i	Rasse XII	Rohrz.	10,5	4,875	0,17	16	5,0
		,,	22,5	4,695	0,35		
		,,	45,2	4,395	0,65		
		Raffin.	15,4	13,405	0,25	16	
		,,	25,1	13,25	0,405		
		,,	40,0	13,07	0,585		

der Saccharasezeitwert nach der von C. O. Sullivan und F. W. Tompson[1] für den zeitlichen Verlauf der enzymatischen Rohrzuckerspaltung mitgeteilten Kurve berechnet wurde, wobei die Reaktionskonstanten 1. Ordnung bei 50proz. Hydrolyse um etwa 15% größer sind als zu Beginn der Reaktion, die Raffinasezeitwerte dagegen nach einer an einem Invertinpräparat aus Löwenbräuhefe ermittelten Kinetik[2], der zufolge die für eine monomolekulare Reaktion berechneten Konstanten im selben Spaltungsbereich um 15% fallen. Es muß daher der Zeitwertquotient um etwa 30% größer sein als das Verhältnis der Geschwindigkeiten zu Reaktionsbeginn. Für die

[1] Jl. chem. Soc. Bd. 57, S. 834 [1890]. [2] A. a. O., S. 189.

Raffinasespaltung durch Oberhefen erwies sich dagegen die Kinetik als annähernd monomolekular, und der früher z. B. für die Kopenhagener Brennereihefe gefundene Quotient 5,1 bis 5,5 stimmt mit dem jetzt ermittelten Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeiten 5,0 überein.

Als Beispiel für eine starke Quotientenverschiebung, die in einem geänderten Mengenverhältnis von Saccharase und Raffinase oder in einer Affinitätsveränderung ihren Grund haben muß, sei der mit Invertin der Rasse XII vom 26. II. 1921 bestimmte Zeitwertquotient 12,3 dem mit einer Lieferung vom 3. VI. 1922 ermittelten Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeiten 5,0 gegenübergestellt.

In Tab. 19 wird die Dissoziationskonstante der Saccharase-Saccharose-Verbindung K_S mit der der Raffinase-Raffinose-Verbindung K_R und mit dem Quotienten der Umsatzgeschwindigkeiten in 0,138n-Lösung verglichen. Für drei aus verschiedenen Brennereihefen gewonnene Autolysate und ein aus Unterhefe dargestelltes Invertinpräparat vom Zeitwert 0,37 und nur noch geringfügigem Gehalt an Melibiase erweist sich das Verhältnis der Dissoziationskonstanten, der Affinitätsquotient $K_R : K_S$, weit innerhalb der Fehlergrenzen als annähernd konstant. Aus den in der 5. Spalte mitgeteilten Zahlen ergibt [69] sich, daß die Affinität der Saccharase zum Rohrzucker und die der Raffinase zur Raffinose durch die natürlichen Begleiter des Invertins in fast gleicher Weise beeinflußt wird. Das wäre ja auch für den Fall zu erwarten, daß die Schwankungen der Zeitwertquotienten durch ein wechselndes Mengenverhältnis zweier einander äußerst ähnlicher Carbohydrasen der Hefe zustande kommen.

Tabelle 19.
Vergleich von Geschwindigkeitsquotient und Affinität verschiedener Invertine.

Invertin	Q (0,138-n)	K_S	K_R	$K_R : K_S$	Q_M	Q_∞
Berliner Rasse II	4,8	0,016	0,24	15	16	2,0
,, ,, XII	5,0	0,016	0,24	15	16	2,0
Dänische Brennereihefe . . .	5,0	0,017	0,27	16	16	1,9
Münchener Brauereihefe . . .	8,3	0,040	0,66	17	17	1,9

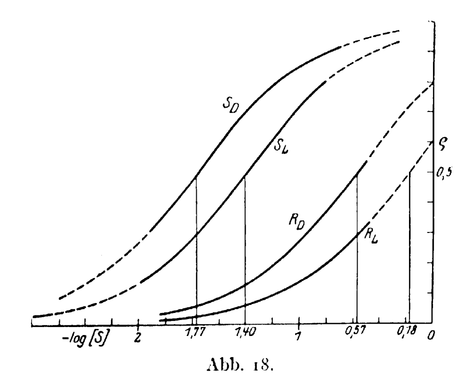


Abb. 18.

In Abb. 18 ist die Dissoziationsrestkurve S_D, durch welche die Abhängigkeit der Saccharasewirkung des dänischen Invertins vom log der reziproken Substratkonzentration am besten dargestellt werden kann, neben der für das Invertinpräparat *e* [70] aus Löwenbräuhefe ermittelten S_L gezeichnet. Der mehr als doppelt so großen Affinität der Oberhefensaccharase entspricht ein Abstand der S_D- und S_L-Kurve von 0,37 Abszisseneinheiten. Fast den gleichen, nämlich 0,39, finden wir zwischen den zugehörigen Raffinasekurven R_D und R_L, von denen nur der experimentell verifizierte Teil ausgezogen ist, während der weitere Verlauf der Dissoziationsrestkurven durch Striche angedeutet wird. Indem wir nun die Ordinaten der R-Kurven durch die in der 2. Spalte der Tab. 19 angeführten Quotienten zu den Ordinaten der S-Kurven ins richtige Verhältnis setzen[1], finden wir:

Wenn zwei Invertine in bezug auf die Affinität zum Rohrzucker übereinstimmen, so ist nicht nur ihre Affinität zur Raffinose gleichfalls übereinstimmend, sondern es ist auch das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten bei beliebiger Zuckerkonzentration identisch. Nur bei verschiedener Affinität des Enzyms ist auch das Geschwindigkeitsverhältnis verschieden. Messen wir jedoch in diesem Falle das Geschwindigkeitsverhältnis nicht in 0,138n-Lösungen des Di- und Trisaccharids, sondern z. B. bei solcher Konzentration, daß jeweils 50% der maximalen Saccharasewirkung erreicht sind, so erweist sich der auf diese Art ermittelte Quotient Q_M (6. Spalte der Tab. 19; über seine Berechnung vgl. vorstehende Abhandlung, II. Kapitel, (22) S. 16) unabhängig vom numerischen Betrag der einzelnen Affinitäten als konstant.

Die mittlere Spezifität des Hefeninvertins für die Hydrolyse von Rohrzucker und Raffinose ist 16, seine Leistungsfähigkeit beträgt etwa 2,0. Der in der letzten Spalte der Tab. 19 für unendlich hohe Substratkonzentration extrapolierte Quotient der Hydrolysengeschwindigkeiten Q_∞ [vgl. vorstehende Abhandlung, Kapitel II, (15) und (17) sowie Kapitel III, S. 25f.] besagt nämlich, daß in diesem für das Trisaccharid denkbar günstigsten Fall mit der gleichen Invertinmenge für jedes gespaltene Raffinosemolekül in derselben Zeit der Umsatz von nur 2 Rohrzuckermolekülen erzielt werden könnte.

[71] Mit Bezug auf die in der I. Abhandlung, Kapitel III, angestellten Überlegungen fassen wir den Inhalt der Tab. 19 dahin zusammen, daß das molare Verhältnis von Saccharase und Raffinase unabhängig vom wechselnden Betrag des Zeitwertquotienten für jedes Invertin dasselbe ist. Es besteht daher kein Grund gegen die Annahme, daß das in den üblichen Hefen enthaltene Invertin sowohl den Rohrzucker als auch die Raffinose zu spalten vermag.

4. Berechnung des Quotienten aus der Affinitätskonstante.

Da Saccharase- und Raffinasewirkung in einem gesetzmäßigen Zusammenhang stehen, ist es möglich, die Geschwindigkeit der Raffinosespaltung für jede beliebige, nicht mehr als 8- bis 10proz. Lösung des Trisaccharids im voraus zu berechnen, wenn

[1] Vgl. Abb. 1 der voranstehenden Abhandlung.

die Abhängigkeit der Saccharasewirkung des betreffenden Invertins von der Rohrzuckerkonzentration bekannt ist. Setzen wir den Affinitätsquotienten des Hefeinvertins $K_R : K_S = 15{,}5$, seine Leistungsfähigkeit für die Hydrolyse von Saccharose und Raffinose = 1,9, so finden wir für die in Tab. 20 angeführten Invertinlösungen und -präparate aus den in der 2. Spalte mitgeteilten Werten von K_S nach der in der I. Abhandlung, Kapitel II, abgeleiteten Gleichung (16) das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten von Rohrzucker und Raffinose in 0,138n-Lösung $Q_{\text{ber.}}$, neben dem in der 4. Spalte der experimentell bei dieser Konzentration gefundene Quotient $Q_{\text{gef.}}$ steht. Die Differenzen zwischen den beobachteten und berechneten Werten übersteigen nicht die Fehlergrenzen der Quotientenbestimmung. Nur bei dem aus amerikanischer Brauereihefe isolierten Invertinpräparat *g* dürfte sich infolge des Gehaltes an Melibiase die Differenz vielleicht noch erhöhen.

Wir sind daher berechtigt, umgekehrt die Konstanz des Quotienten

$$\frac{\text{Raffinasezeitwert}}{\text{Saccharasezeitwert}},$$

die sich bei Vergleich zahlreicher Invertinpräparate verschiedenen Reinheitsgrades[1] und beim Vergleich der Hefe mit [72] den daraus gewonnenen Autolysaten[1]) ergab, in Ergänzung von Kapitel II, Abschnitt 3, als Beweis für die Unabhängigkeit der Invertinaffinitäten vom Reinheitsgrad zu betrachten. Aus dem gleichen Grunde deuten wir die an der Brennereiheferasse XII beobachtete Quotientendifferenz (S. 68) als Affinitätsänderung des Invertins.

Tabelle 20.
Berechnung des Quotienten aus der Rohrzuckeraffinität des Invertins.

Invertin (vgl. Kapitel II, Abschnitt 2)	K_S	$Q_{\text{ber.}}$	$Q_{\text{gef.}}$	$Q_{\text{ber.}} - Q_{\text{gef.}}$
c aus Löwenbräuhefe	0,029	6,7	6,7	± 0,0
d ,, ,,	0,040	8,1	8,0	+ 0,1
e ,, ,,	0,040	8,1	8,3	− 0,2
f ,, Brennereihefe Kopenhagen	0,017	5,2	5,0	+ 0,2
g ,, amerikanischer Brauereihefe	0,020	5,4	6,1	− 0,7
h ,, Rasse II	0,016	5,0	4,8	+ 0,2
i ,, Rasse XII	0,016	5,0	5,0	± 0,0

5. Versuch mit Kochsaft.

Durch Kochsäfte wird, wenn der Rohrzucker und sein β-Galaktosid durch dieselben wirksamen Gruppen des Invertins angegriffen werden, auch das Verhältnis ihrer Hydrolysengeschwindigkeiten in dem Sinne geändert werden, wie es der im II. Kapitel, Abschnitt 6, beschriebenen Affinitätsverminderung des Enzyms gegenüber der Saccharose allein entspricht. Für den folgenden Versuch diente das Autolysat *i* der Rasse XII ($K_S = 0{,}016$) und das durch Erhitzen inaktivierte Autolysat *a* der Löwenbräuhefe. Zur Hydrolyse der Raffinose wurde 6,67 mal mehr wirksames Enzym und 5 mal mehr Kochsaft verwendet als zur Rohrzuckerinversion.

[1] Diese Zs. Bd. 115, S. 180 [1921], und zwar S. 192.
[1]) Ebenda, S. 194.

Die Drehungsabnahmen nach 10 Minuten verhalten sich wie 16:16,5. Daraus ergibt sich der Quotient 6,5 (ber. 6,7), während er ohne Kochsaft (vgl. Tab. 18) 5,0 betrug.

[73] Saccharosespaltung:

Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)
0,0	[4,90]	—
2,0	4,87	0,03
17,3	4,63	0,27
30,0	4,415	0,485
44,2	4,19	0,71

Raffinosespaltung:

Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)
0,0	[13,57]	—
2,0	13,54	0,03
13,8	13,345	0,225
24,8	13,14	0,43
40,0	12,90	0,67

IV. Zur Kinetik der Invertinwirkungen.

Vor kurzem haben R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN über Versuche[1] berichtet, die mit Invertinpräparaten hohen Reinheitsgrades angestellt wurden, um den zeitlichen Verlauf der enzymatischen Rohrzuckerinversion kennenzulernen. Die widersprechenden Angaben der Literatur über die Kinetik der Invertinwirkung ließen sich nicht auf Verunreinigungen zurückführen. Die Divergenzen der Beobachtungen an Hefeauszügen wiederholten sich beim gereinigten Invertin. Dabei wurde beobachtet, „daß die Invertinkinetik, die nach L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN[2] von der Wasserstoffzahl unabhängig sein soll, von dieser im Gegenteil stark beeinflußt wird."

„Es wird zu prüfen sein, ob die Affinitäten des Invertins zum Substrat und zu den Spaltungsprodukten von der Wasserstoffionenkonzentration wesentlich beeinflußt werden. Da aber auch bei konstantem p_H, nämlich bei optimalem, verschiedener Reaktionsverlauf vorkommt, so wird ferner zu untersuchen sein, was den Zustand des Invertins beeinflußt und ob der Fall vorkommt, daß die Summe der Affinitäten der Saccharase zu den beiden Spaltprodukten gleich der Affinität zur Saccharose ist."

Im II. Kapitel, Abschnitt 4, wurde gezeigt, daß die Wirkung der $H^{\cdot}$-Ionen auf das Invertin nicht auf eine Änderung der [74] Affinität des Enzyms oder des Rohrzuckers zurückgeführt werden kann und daß allgemein die Beteiligung von $H^{\cdot}$-Ionen an einem Dissoziationsgleichgewicht des Invertins, der Saccharose oder der Rohrzucker-Invertin-Verbindung nicht möglich scheint. Es wird sich bei der Untersuchung anderer Enzymreaktionen ergeben, ob beim Invertin-Saccharose-System zufällig zwei Gleichgewichte durch wechselnde h in solcher Weise verschoben werden, daß wir es weder an den Aktivitäts-[$H^{\cdot}$]-, noch an den Aktivitäts-[S]-Kurven bemerken können. Die Abhängigkeit der Invertinkinetik vom p_H müßte demnach in der Affinität der reduzierenden Spaltprodukte zum Invertin ihren Grund haben, die in der Nähe des

[1] Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], Kap. D, II, 2.
[2] Biochem. Zs. Bd. 35, S. 386 [1911].

Neutralpunktes doppelt so groß wäre, als bei der für die Zerfallsgeschwindigkeit der Saccharase-Saccharose-Verbindung optimalen h[1].

Die wechselnde Kinetik bei optimaler Wasserstoffzahl wird sich auf die Affinitätsverschiedenheiten des Invertins gegenüber dem Rohrzucker zurückführen lassen.

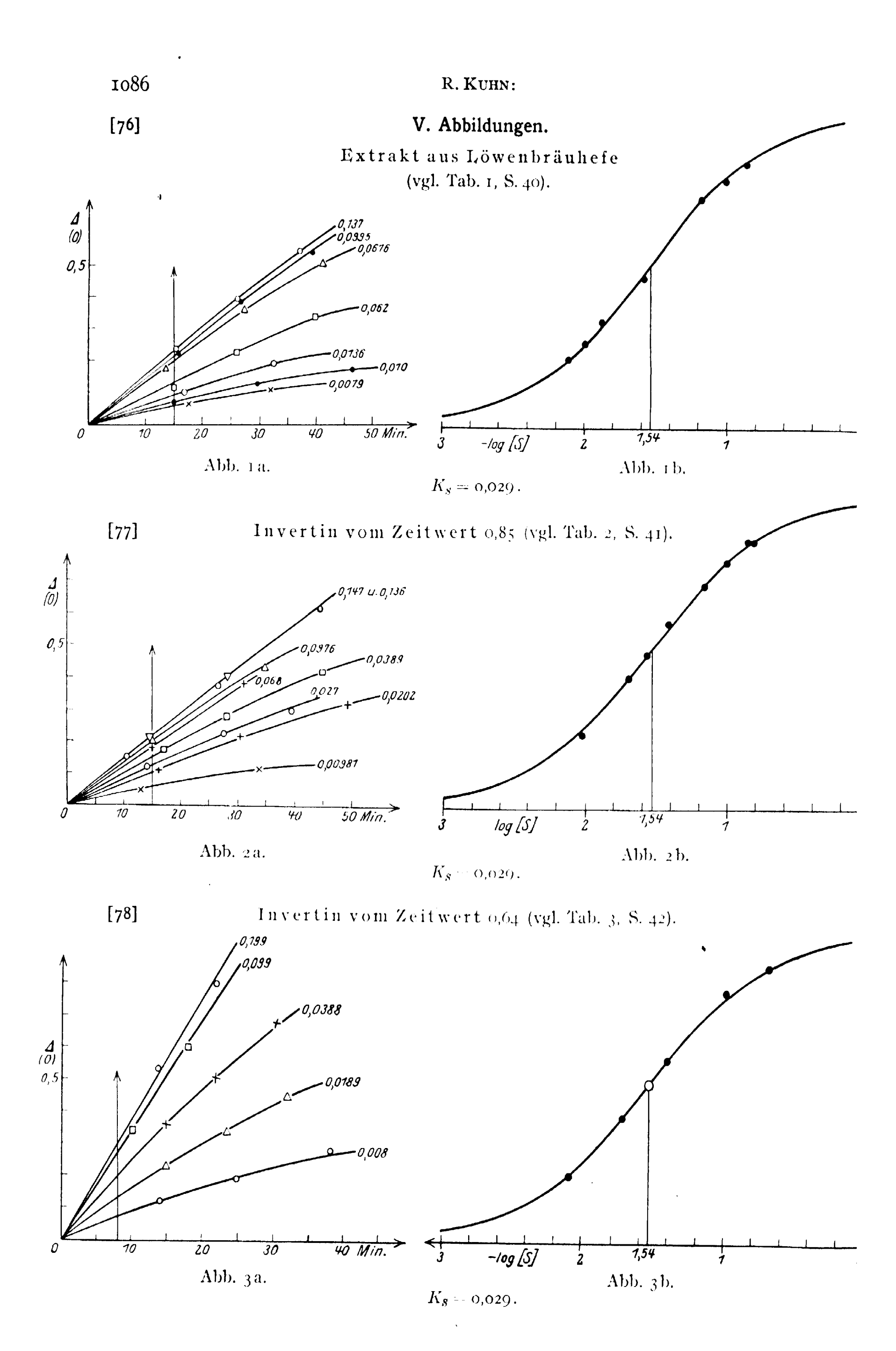
Obwohl der in der III. Mitteilung über Invertin überwiegend beobachtete Reaktionsverlauf durch die Gleichung von L. MICHAELIS und M. L. MENTEN weit besser dargestellt wird, als durch das vielfach geltend befundene Gesetz für eine monomolekulare Reaktion, ist doch überall ein leichtes Fallen der Konstanten zu bemerken. Am stärksten trat dies beim Präparat *l* ein (Tab. 13 der III. Mitteilung über Invertin), dem die geringste Affinität zum Rohrzucker zukommt. Mit Invertin der Rasse XII, das die höchste bisher gemessene Saccharoseaffinität besitzt, findet man[2] dagegen die nach MICHAELIS berechneten Konstanten ansteigend. Das ist nur möglich, wenn die natürlichen Begleiter des Invertins die Affinität zum Rohrzucker stärker vermindern, als zu den Spaltprodukten. Die auf S. 59f. gegebene Erklärung für die Wirkung arteigener und artfremder [75] Kochsäfte läßt diese Erscheinung voraussehen. Bei Verringerung der Affinität wird das Verhältnis zwischen den an die reaktionsfähigen Gruppen gelangenden und den in Lösung befindlichen Zuckermolekülen für die Hexosen günstiger bleiben als für das Disaccharid. Dasselbe gilt dann für das Verhältnis, in dem Saccharose und Raffinose an die aktiven Gruppen gelangen. Die im 2. Abschnitt des III. Kapitels mitgeteilten Zahlen deuten in der Tat darauf hin, daß mit wachsendem K_S auch der Affinitätsquotient $K_R:K_S$ zunimmt. Diese Zunahme liegt jedoch innerhalb der Fehlergrenzen der direkten K_R-Bestimmung. Da ein und dasselbe Enzym die Hydrolyse von Rohrzucker und Raffinose bewirkt, wird sich die Affinität des Invertins zum Trisaccharid jetzt auch auf indirektem Wege bestimmen lassen, z. B. aus der Verlangsamung der Rohrzucker- und Raffinosehydrolyse durch das gemeinsame Spaltprodukt Fructose.

[1] Die Abhängigkeit der Invertinkinetik vom p_H konnte jedoch nur mit weitgehend gereinigten Enzymlösungen reproduziert werden. Mit Hefeautolysaten erhält man mitunter noch bei $p_H > 7$ ansteigende Reaktionskonstanten 1. Ordnung.

[2] Die Versuche werden in einer späteren Mitteilung bekanntgegeben.

[76]

V. Abbildungen.



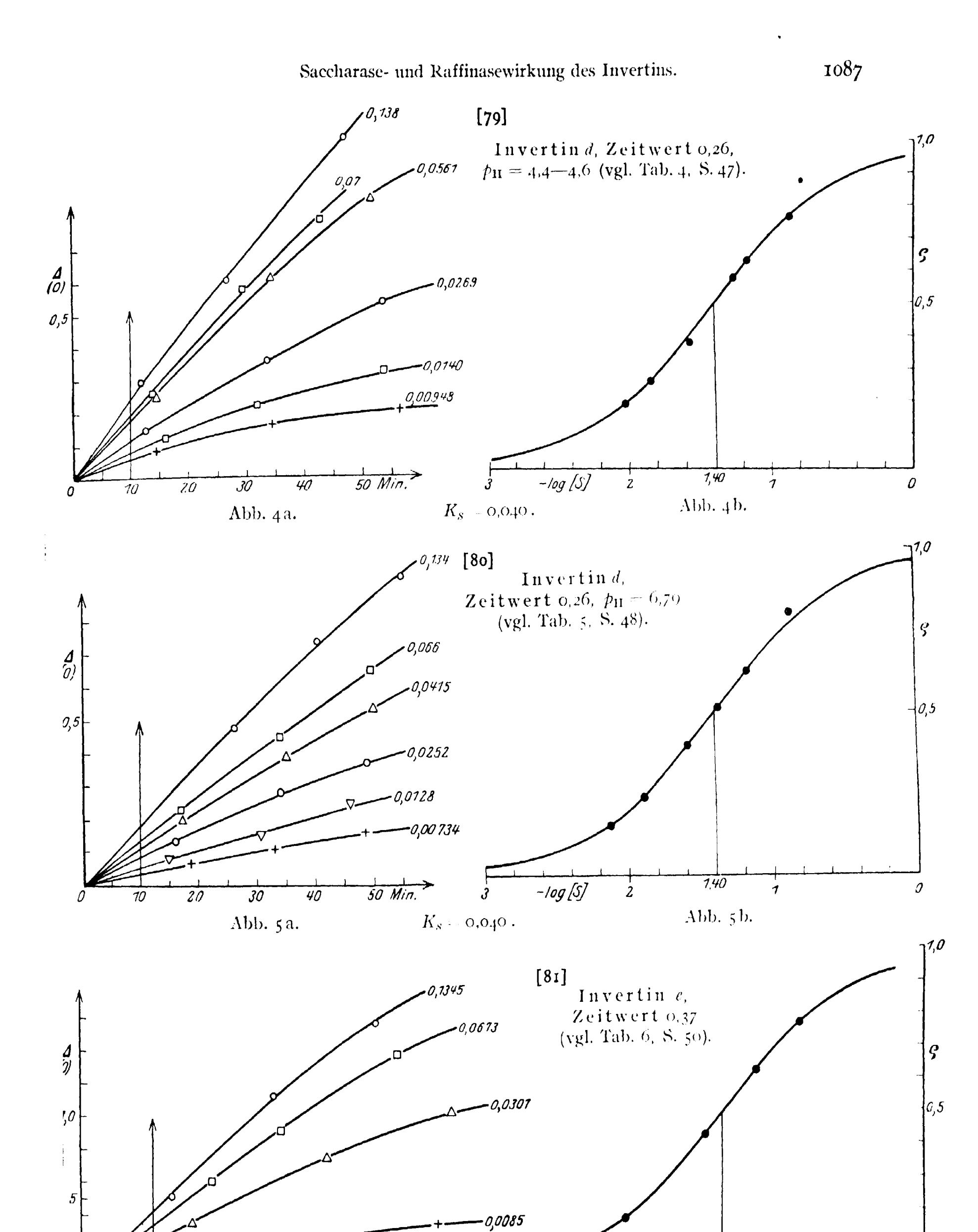


Abb. 4a. K_s = 0,040. Abb. 4b.

Abb. 5a. K_s = 0,040. Abb. 5b.

Abb. 6a. K_s = 0,040. Abb. 6b.

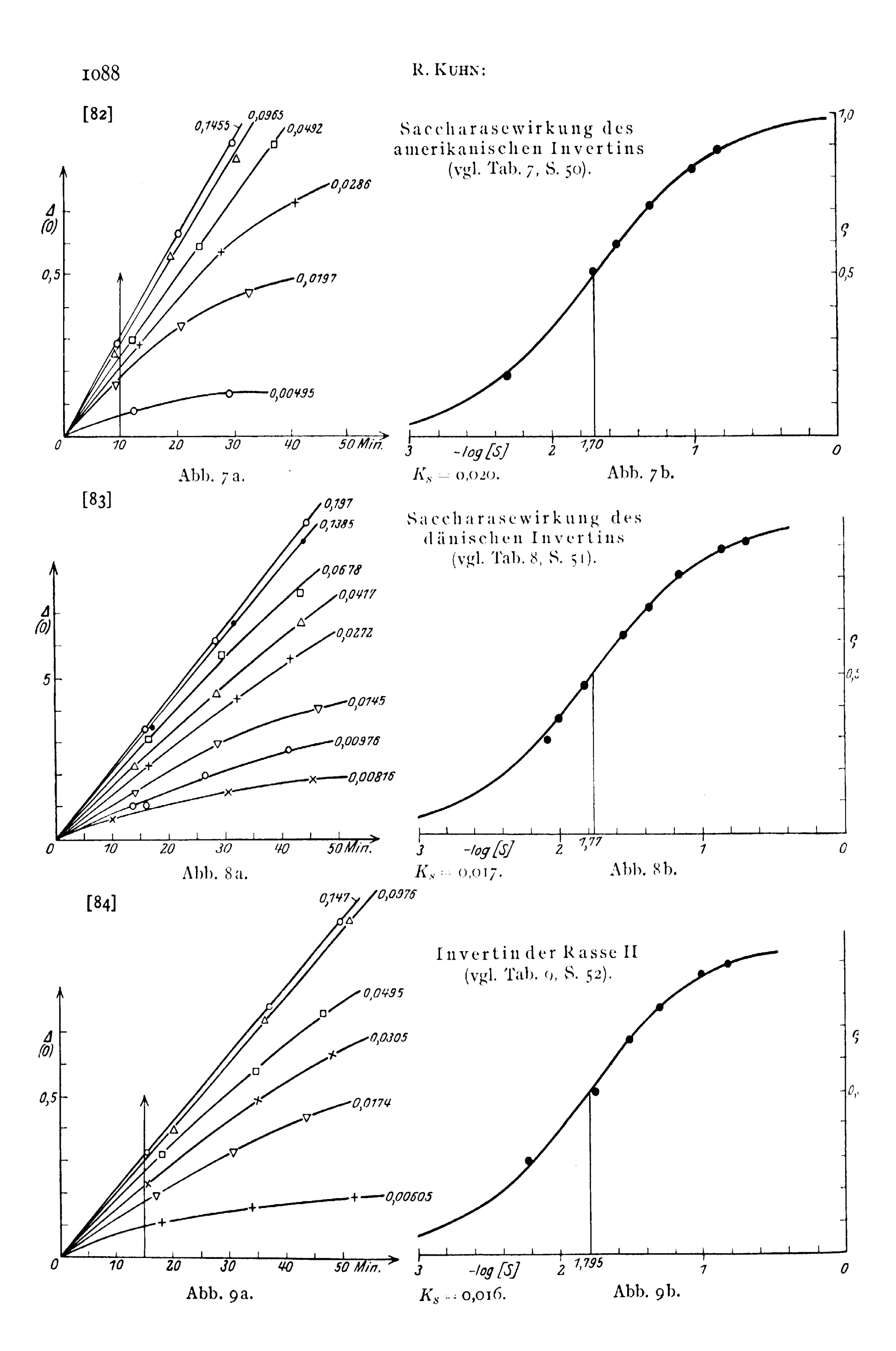


Abb. 7a. $K_s = 0{,}020$. Abb. 7b.

Abb. 8a. $K_s = 0{,}017$. Abb. 8b.

Abb. 9a. $K_s = 0{,}016$. Abb. 9b.

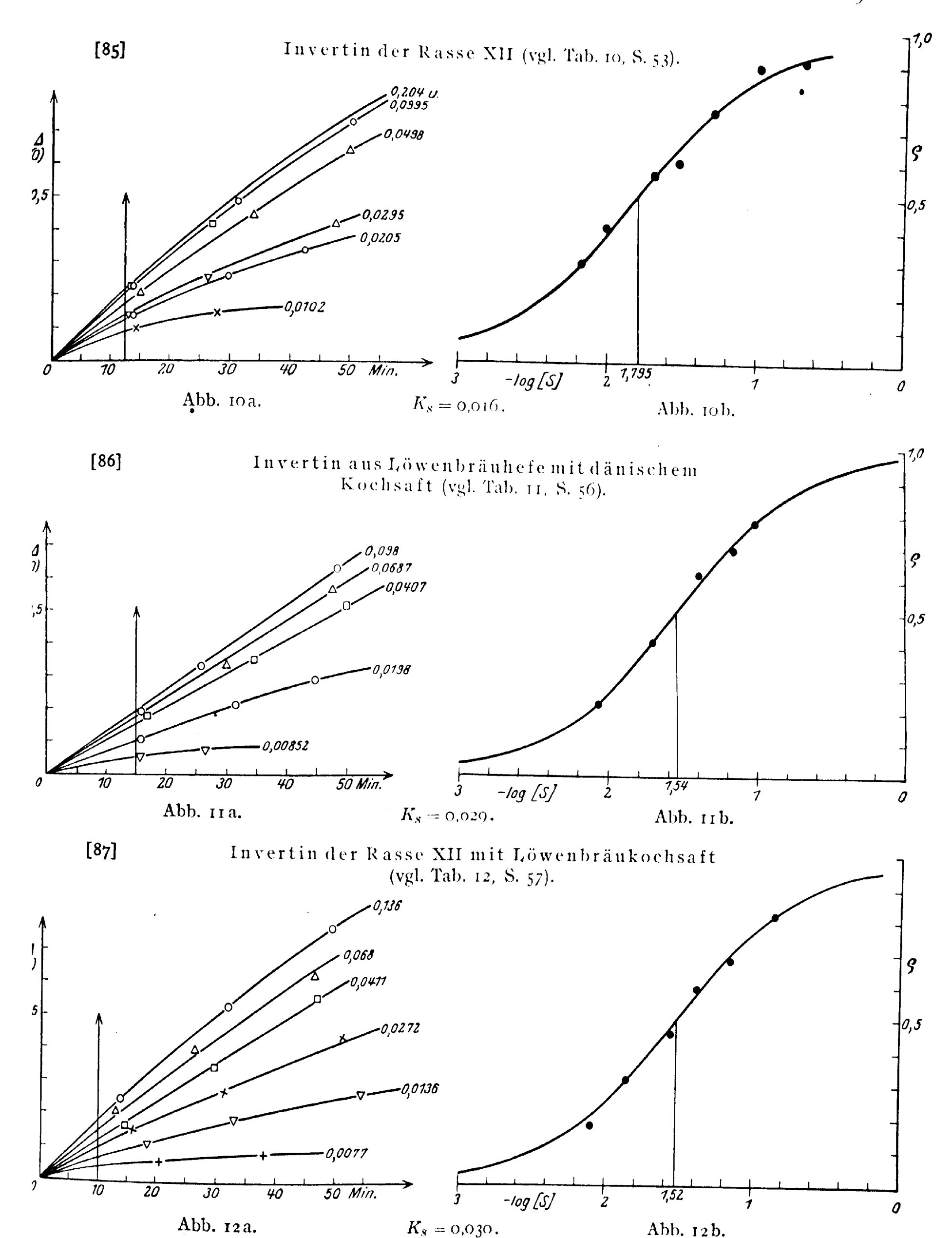


Abb. 10a. $K_s = 0,016$. Abb. 10b.

Abb. 11a. $K_s = 0,029$. Abb. 11b.

Abb. 12a. $K_s = 0,030$. Abb. 12b.

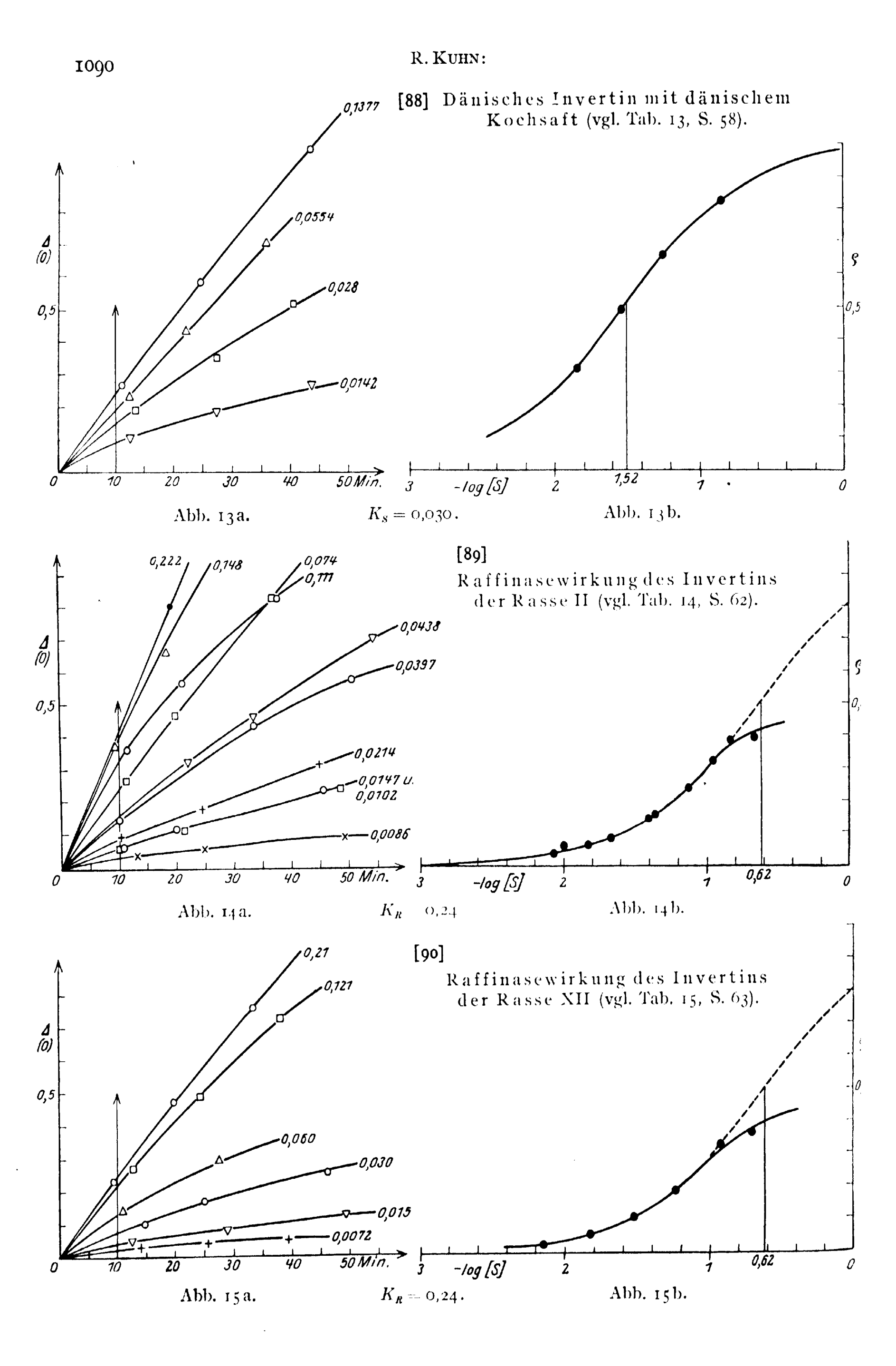


Abb. 13a. $K_S = 0{,}030$. Abb. 13b.

Abb. 14a. $K_R = 0{,}24$. Abb. 14b.

Abb. 15a. $K_R = 0{,}24$. Abb. 15b.

[91] Raffinasewirkung des Dänischen Invertins (vgl. Tab. 16, S. 64).

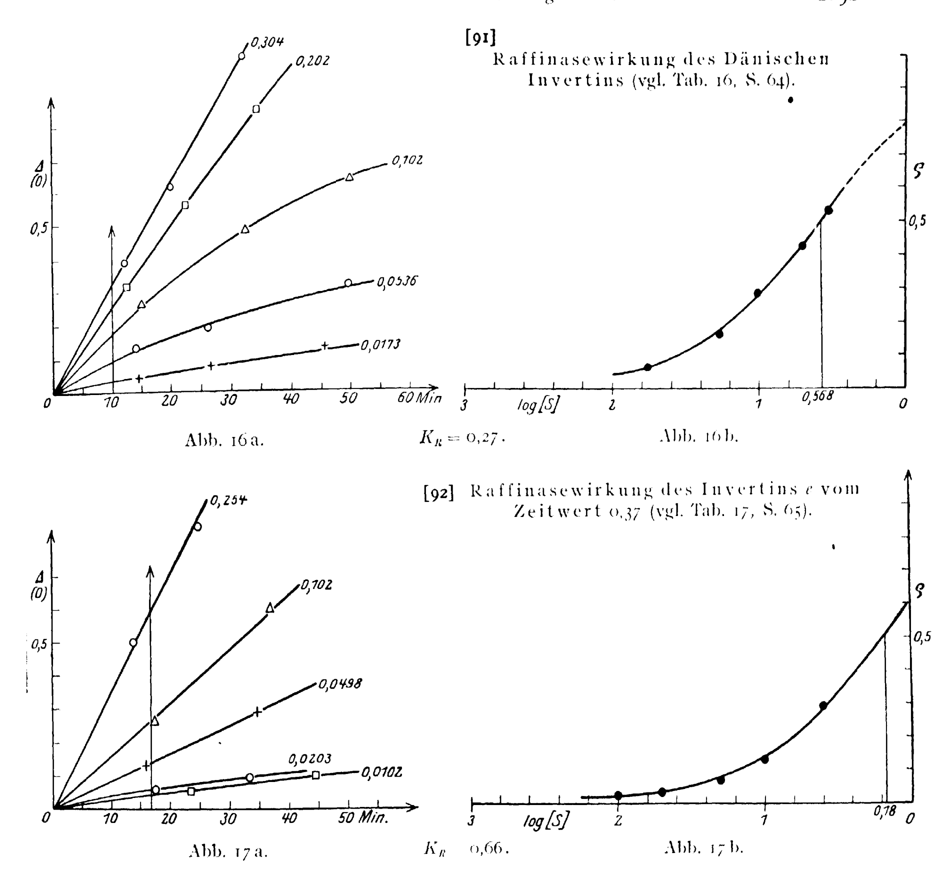


Abb. 16a. $K_R = 0,27$. Abb. 16b.

[92] Raffinasewirkung des Invertins *c* vom Zeitwert 0,37 (vgl. Tab. 17, S. 65).

Abb. 17a. K_R 0,66. Abb. 17b.

Zeitschrift für physiologische Chemie **127**, S. 234 [1923].

82. ÜBER SPEZIFITÄT DER ENZYME.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und RICHARD KUHN.

III[1]. Die Affinität der Enzyme zu stereoisomeren Zuckern*.

Von RICHARD KUHN.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. Januar 1923.)

Als Hauptergebnis seiner Untersuchungen über Fermente bezeichnete E. FISCHER[2] ihr differierendes Verhalten gegen Stoffe von äußerst ähnlicher Konfiguration. Das bekannteste und best untersuchte Beispiel lieferte die Einwirkung von Hefeauszügen und von Emulsin auf α- und β-Glucoside. Es scheint aber bis heute noch kein Versuch vorzuliegen, der es gestattet, solche Erscheinungen auf die verschiedene Affinität der Enzyme zu den diesen Glucosiden zugrunde liegenden stereoisomeren Formen der Zucker zurückzuführen.

Für eine noch unbekannte Teilreaktion im zymatischen Abbau der Hexosen läßt sich aus dem von R. WILLSTÄTTER und H. SOBOTKA[3] gezogenen „Vergleich von α- und β-Glucose in der Gärung" schließen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit [235] beider Formen ungleich ist. Im Gemisch wird nämlich die α-Glucose der β-Form vorgezogen[1]), obwohl jede für sich allein gleich schnell vergoren wird. Da sich auch die bemerkenswerten Versuche von H. J. HAMBURGER[2]) über die Permeabilität der

[1] I. und II. Abhandlung: R. KUHN, Diese Zs. Bd. 125, S. 1 und S. 28 [1922/23] (*Abh. 80 und 81*).

* *Vgl. Abhandl. 83 und namentlich die späteren Untersuchungen von R. Kuhn und H. Münch, „Über Gluco- und Fructosaccharase" I und II, Zeitschr. f. physiol. Chem. 150, S. 220 [1925], und 163, S. 1 [1926/27].*

[2] Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie, Diese Zs. Bd. 26, S. 60 [1898]; Unters. über Kohleh. und Ferm. S. 116, und zwar S. 133.

[3] Diese Zs. Bd. 123, S. 164 [1922] (*Abh. 68*).

[1]) Die nachträgliche Drehungszunahme einer teilweise vergorenen Glucoselösung hat schon C. S. HUDSON, Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 31, S. 655 [1909], und zwar S. 662, beschrieben. R. WILLSTÄTTER und R. KUHN.

[2]) H. J. HAMBURGER und R. BRINKMAN, Biochem. Zs. Bd. 88, S. 97 [1918]; H. J. HAMBURGER, Koninkl. Akad. v. Wetensch. Amsterdam, Proc. Bd. XXII, Nr. 4, S. 351 und S. 360 [1919]; H. J. HAMBURGER und R. BRINKMAN, Biochem. Zs. Bd. 94, S. 131 [1919]; H. J. HAMBURGER, Biochem. Zs. Bd. 128, S. 185 und S. 207 [1921/22]; Klin. Wochenschr. Bd. 1, S. 418 [1922].

Glomerulusmembran der Froschniere, die z. B. d-Galaktose partiell zurückhält[3], auf noch wenig geklärte, komplizierte Mechanismen beziehen, möchte ich durch einige Disaccharid- und Glucosidhydrolysen, die unter Zusatz von α- und β-Glucose ausgeführt wurden, die spezifischen Affinitäten der Enzyme beleuchten[4]:

Weder das Invertin der Münchener Löwenbräuhefe, noch die salicin- und helicinspaltenden Komponenten eines aus bitteren Mandeln gewonnenen Emulsinpräparates weisen eine meßbare Affinität zur α-Glucose auf[5]. Die in der Literatur beschriebene Hemmung der Rohrzucker-, Salicin- und Helicinspaltung durch Dextrose ist daher ausschließlich der niedrig drehenden Modifikation des Traubenzuckers zuzuschreiben. Die [236] von verflüssigter Hefe bewirkte Malzzuckerhydrolyse fand ich dagegen durch beide Stereoisomere in annähernd gleicher Weise beeinflußt.

Diese Versuche werden Schlußfolgerungen auf den Wirkungsmechanismus der Enzyme erlauben. Sie zeigen zugleich, daß für biochemische und namentlich enzymatische Untersuchungen bei Verwendung leicht isomerisierbarer Stoffe, wie mutarotierender Zuckerarten, eine genaue Angabe über die Darstellungsweise der Lösungen, den Zeitpunkt ihrer Verwendung usw., unerläßlich ist. Die Erkenntnis, daß z. B. eine „5proz. Glucoselösung" ein undefiniertes und veränderliches Gemisch zweier Stoffe von völlig verschiedenartigem Verhalten darstellen kann, macht nicht wenige Angaben der Enzymliteratur wertlos und eine Reihe von Widersprüchen verständlich.

1. Invertin.

Als Ursache für den wechselnden Verlauf der enzymatischen Rohrzuckerhydrolyse[1]) wurde vor kurzem[2]) die verschiedene Affinität des Enzyms zu seinem Substrat wahrscheinlich gemacht. Für die theoretische Ableitung der Zeit-Umsatz-Kurven sollte nun auch die Affinität zu den Spaltprodukten mit Präparaten von verschiedener Rohrzuckeraffinität bestimmt werden. Da aber nach C. S. HUDSON[3]) bei der Hydrolyse primär α-Glucose auftritt und sich diese im Verlaufe der Reaktion mit der β-Modifikation ins Gleichgewicht setzt, während immer wieder hochdrehender Traubenzucker aus dem Disaccharid entbunden wird, ist es notwendig, die Dissoziationskonstanten $\frac{[\text{Saccharase}]\,[\alpha\text{-Glucose}]}{[\text{Saccharase-}\alpha\text{-Glucose}]}$ und $\frac{[\text{Saccharase}]\,[\beta\text{-Glucose}]}{[\text{Saccharase-}\beta\text{-Glucose}]}$ einzeln zu kennen.

[3] Ob es sich um die α- oder um die β-Form handelt, ist unbekannt. Gleichgewichts-d-Glucose wird vollständig zurückgehalten, l-Glucose dagegen durchgelassen.

[4] Die unter Zusatz anderer α- und β-Zucker ausgeführten Versuche sowie die Beweise dafür, daß die Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeiten auf Affinität der Enzyme zu den Hexosen beruht (Parallelverschiebung der Aktivitäts-p_S-Kurven), werden später mitgeteilt.

[5] Die Abhängigkeit der Invertinkinetik vom p_H (R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 63ff.) ist somit auf die Affinität des Enzyms zu den reduzierenden Spaltprodukten zurückgeführt, die wegen der rascheren Mutarotation der α-Glucose in Nähe des Neutralpunktes etwa doppelt so groß erscheint als bei optimalem p_H. Vgl. diese Zs. Bd. 125, S. 74 [1922/23].

[1]) R. WILLSTÄTTER, J. GRASER und R. KUHN, Diese Zs. Bd. 123, S. 1 [1922], und zwar S. 63ff. (*Abh. 48*).

[2]) R. KUHN, Diese Zs. Bd. 125, S. 28 [1922/23], und zwar Kap. IV, S. 73f.

[3]) Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 30, S. 1160 und S. 1564 [1908] und Bd. 31, S. 655 [1909].

[237] Im Gegensatz zu den Angaben von V. HENRI[1], H. P. BARENDRECHT[2] und L. MICHAELIS[3] hatte E. F. ARMSTRONG[4] keinen Einfluß der Dextrose auf die Inversionsgeschwindigkeit des Rohrzuckers durch Hefeinvertin beobachtet. Es zeigt sich nun, daß die Affinität des Enzyms zur β-Glucose beträchtlich, zur α-Glucose dagegen unmeßbar gering ist[5]. Die in Tab. 1 angeführten Versuche lassen vermuten, daß ARMSTRONG im Gegensatz zu den anderen Beobachtern frisch gelösten Traubenzucker angewandt hat. Dies gilt auch für einen Versuch BARENDRECHTS[6], der mit und ohne Zusatz der äquivalenten Glucosemenge in 0,2n-Rohrzuckerlösung gleiche Anfangsgeschwindigkeiten beobachtete. Erst bei längerer Versuchsdauer blieb der Umsatz im Glucoseexperiment hinter dem des Kontrollversuches zurück.

α-Glucose: Traubenzucker MERCK, puriss., wasserfrei, für Infusionen; daraus nach R. BEHREND[7]

β-Glucose: pyridinfrei; $[\alpha]_D^{19,0} = +19,0°$ in 2proz. Lösung (für die Zeit $t = 0$ extrapoliert).

Die Hexosen wurden in 30° warmem Wasser gelöst, mit der vorgewärmten Rohrzucker-Phosphatlösung gemischt und 2 Minuten darauf 2 ccm Saccharaselösung (*b* der II. Abh., Kap. II, Abschn. 2[8]) zugesetzt[9]. In der letzten Spalte der Tabelle sind die Mittelwerte der für eine mono-

[238] Tabelle 1. Inversion bei 30,05 ± 0,05°. Polarisation bei 19°.

Nr.	Zucker	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Spaltung %	$k \cdot 10^4$	Mittel
1.	0,1 n-Saccharose	0,0	[3,615]	—	—	—	
		1,6	3,555	0,26	5,5		
		7,0	2,56	1,055	22,2	157	**158,5**
		12,5	1,88	1,735	36,5	158	
		16,5	1,45	2,165	45,6	161	
2.	0,1 n-Saccharose	0,0	[5,31]	—	—	—	
	+ 0,11 n-α-Glucose	1,6	5,03	0,28	5,9	—	
		5,75	4,40	0,915	19,3	163	**158,5**
		12,55	3,58	1,74	36,7	158	
		19,3	2,95	2,37	49,5	154	
3.	0,1 n-Saccharose	0,0	[5,29]	—		—	
	+ 0,11 n-β-Glucose	2,0	5,04	0,25	5,4		
		11,0	3,98	1,31	28,2	130	**137,5**
		19,0	3,20	2,09	45,0	137	
		30,0	2,345	2,945	63,5	146	

[1] Thése, Paris 1903; C. R. Bd. 115, S. 916 [1902].

[2] Zs. physikal. Chem. Bd. 49, S. 456 [1904].

[3] L. MICHAELIS und M. L. MENTEN, Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913].

[4] Proc. Roy. Soc. London, Bd. 73, S. 516 [1904], und zwar S. 520.

[5] Die Ansicht, daß die Einstellung der Hefe auf die Hydrolyse von α-Glucosiden eine ähnliche Verwandtschaft ihrer Enzyme zu den entsprechenden Glucosen und damit z. B. die auswählende Gärung von Zuckergemischen bedingen möge (R. WILLSTÄTTER und H. SOBOTKA, a. a. O., und zwar S. 166f.), bedarf somit der Einschränkung.

[6] Zit. nach R. O. HERZOG in C. Oppenheimers „Die Fermente", 4. Aufl., Bd. II, S. 977 [1913].

[7] Liebigs Ann. der Chem. Bd. 353, S. 106f. [1907].

[8] K_s nach 5 Monaten ungeändert = 0,029; S.W. = 1,18, S.W.$_{red.}$ = 1,24; vgl. R. WILLSTÄTTER und R. KUHN, Chem. Ber. Bd. 56, S. 509 [1922/23] (*Abh. 6*).

[9] Näheres über die Ausführung der Versuche: Diese Zs. Bd. 125, S. 28 [1922/23], und zwar S. 36.

Tabelle 2. Hydrolyse bei 30,05 ± 0,05°. Polarisation bei 18,5°.

Nr.	Zucker	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Spaltung %	$k \cdot 10^4$	Mittel
1.	0,072 n-Raffinose	0,0	[7,255]	—	—	—	
		1,5	7,055	0,20	5,0	—	
		6,5	6,45	0,805	23,8	183	173
		17,3	5,62	1,635	48,5	167	
		26,5	5,075	2,18	64,5	170	
2.	0,072 n-Raffinose	0,0	[8,96]		—	—	
	+ 0,11 n-α-Glucose	2,0	8,60	0,36	10,6		
		7,3	7,90	1,06	31,4	225	176
		17,25	7,35	1,61	47,7	163	
		27,0	7,00	1,96	58,0	140	
3.	0,072 n-Raffinose	0,0	[8,925]		—		
	+ 0,11 n-Gleichgewichts-	2,5	8,70	0,225	6,7	—	
	Glucose	8,7	8,18	0,745	22,0	125	120
		16,1	7,75	1,175	34,8	115	
		24,5	7,25	1,675	49,5	121	

molekulare Reaktion berechneten Konstanten, die im Laufe der [239] Versuchszeit von 15 bis 30 Minuten beobachtet wurden, angeführt. In Übereinstimmung mit dem Auftreten bzw. Verschwinden der hemmenden β-Glucose fallen die Konstanten in Versuch Nr. 2 mit α-Glucose, während sie in Versuch Nr. 3 (mit β-Glucose) stärker ansteigen als im Kontrollversuch Nr. 1.

Die Beobachtung, daß frisch gelöster Traubenzucker für das Ausmaß des enzymatischen Umsatzes ohne Belang ist, hat sich unter Änderung der Rohrzucker- und Glucosekonzentration und bei Anwendung einer Saccharaselösung von geringerem Reinheitsgrade (S.W. = 0,42) bestätigt.

Wenn die hemmende Wirkung der β-Hexose durch Konkurrenz mit dem Disaccharid um das Invertin zu erklären ist, dann muß die Hydrolyse eines anderen Substrates, die gleichfalls durch Invertin erfolgt, durch β-Glucose im selben Sinne beeinflußt werden. Dies trifft nach Tab. 2 für die Hydrolyse der Raffinose zu. Ein Einfluß von α-Glucose ist auch hier nicht zu erkennen[1].

2. Maltase.

Über den Einfluß des Spaltproduktes auf die Wirksamkeit der Hefemaltase liegen Angaben von E. F. ARMSTRONG[2] und von HERZOG und KASARNOWSKI[3] vor. Übereinstimmend[4] wurde eine bedeutende Verlangsamung der Hydrolysengeschwindigkeit beobachtet. Nach Tab. 3 scheint die β-Glucose an diesem Effekte nur wenig stärker beteiligt zu sein als die α-Form. Doch ist die raschere Mutarotation bei der für die Maltasewirkung optimalen Acidität zu berücksichtigen.

[1] Über die Ausführung der Versuche, zu denen ein Invertinpräparat vom S.W. = 1,05 angewandt wurde, vgl. Diese Zs. Bd. 125, S. 28 [1922/23], und zwar S. 60.

[2] Proc. Roy. Soc. London Bd. 73, S. 516 [1904], und zwar S. 520.

[3] R. O. HERZOG und H. KASARNOWSKI in C. Oppenheimer „Die Fermente", 4. Aufl., Bd. II, S. 988 [1913].

[4] Die Angabe in C. Oppenheimers „Die Fermente und ihre Wirkungen", 4. Aufl., Bd. II, S. 988 [1913], die sich auch in H. v. EULERS „Chemie der Enzyme", II. Teil, 1. Abschn., auf S. 156f. findet, daß nämlich ARMSTRONG keine Hemmung durch Dextrose beobachtet habe, dürfte auf einem Versehen beruhen.

22 g frische Hefe der Münchener Löwenbrauerei (21. XII. 1922) wurden nach dem Verfahren von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT[5] [240] mit 2 ccm Essigester verflüssigt. Zum Neutralisieren der mit 40 ccm Wasser verdünnten Suspension genügten 2,3 ccm 1proz. Ammoniak. Sie wurde im Meßkolben auf 100 ccm gebracht, ohne in weiteren 4 Stunden Säure nachzuliefern. Zu den folgenden Versuchen wurden je 20 ccm angewandt, die die phosphathaltige Zuckermischung (5 ccm m/3-Phosphat entsprechend $p_H = 6{,}8$) auf 100 ccm ergänzten. Zur Bestimmung des Drehungsvermögens wurden je 20 ccm in 5 ccm 2 n-Sodalösung eingetragen und unter Zusatz von spanischer Klärerde von der Hefe abfiltriert.

Tabelle 3. Hydrolyse bei 30,00 ± 0,05°. Polarisation bei 19°.

Nr.	Zucker	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Spaltung %	$k \cdot 100^4$	Mittel
1.	0,139 n-Maltose	0,0	[9,87]	—	—	—	
		2,2	9,70	0,17	3,0	—	
		11,0	9,11	0,76	13,4	57,5	53,5
		21,0	8,60	1,27	22,4	53	
		29,5	8,25	1,62	28,6	49,5	
2.	0,139 n-Maltose + 0,11 n-α-Glucose[1])	0,0	[12,115]	—	—	—	
		2,0	12,025	0,09	—	—	
		10,3	11,65	0,465	8,2	37	32
		21,6	11,335	0,78	13,8	30	
		30,1	11,10	1,015	17,9	28,5	
3.	0,139 n-Maltose + 0,11 n-β-Glucose	0,0	[12,10]	—	—	—	
		2,2	12,00	0,10	—	—	
		10,8	11,65	0,45	7,9	34	30,5
		20,4	11,34	0,76	13,4	30,5	
		32,3	11,10	1,00	17,5	26	

3. Emulsin.

Nach E. F. ARMSTRONG[2]) bewirkt Glucose eine beträchtliche Verzögerung der Emulsinwirkung auf β-Glucoside. V. HENRI[3]) hat den Einfluß der Reaktionsprodukte auf die [241] Hydrolyse des Salicins näher untersucht. Nach dem Ergebnis der in Tab. 4 mitgeteilten Versuche ist hochdrehender Traubenzucker nicht imstande, die Umsatzgeschwindigkeit des Salicins und Helicins zu beeinflussen. Das betreffende Enzym [242] des Emulsins, die β-Phenylglucosidase[1]], besitzt also nur zu derjenigen Form der Glucose eine meßbare Affinität, auf deren Derviate sich auch die hydrolytische Wirksamkeit beschränkt.

Für die Versuche mit Salicin dienten je 12,5 mg, für die mit Helicin je 5 mg Emulsin MERCK[2]] in 50 ccm Zucker-Glucosid-Mischung. Puffer: n/50-Acetat. α- und β-Glucose wurden 2 Minuten vor Zusatz des Enzyms in Wasser von 30° gelöst. Unter den gewählten Versuchsbedingungen entspricht der vollständigen Spaltung des Salicins eine Drehungszunahme von 0,876°, der des

[5] Diese Zs. Bd. 111, S. 157 [1920], und zwar S. 168 (*Abh. 62*).

[1]) H. P. BARENDRECHT gibt in der Zs. f. physikal. Chem. Bd. 49, S. 456 [1904], und zwar S. 476, an, daß die Maltasewirkung durch α- und β-Glucose (worunter er die Gleichgewichtsform versteht) im selben Maße verzögert wird. Es finden sich aber keine Zahlenangaben.

[2]) Proc. Roy. Soc. London, Bd. 73, S. 516 [1904], und zwar S. 520.

[3]) Lois générales de l'action des diastases, Paris 1903.

[1]] R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER, Diese Zs. Bd. 121, S. 183 [1922], und zwar S. 185; H. v. EULER hat für dieses Enzym den Namen Salicase vorgeschlagen, Ch. d. Enzyme, 2. Aufl., II. Teil, 1. Abschn., S. 222 [1922].

[2]] Präparat Nr. 9 der Abhandlung von R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER.

Tabelle 4. Hydrolyse bei 30,05 ± 0,05°. Polarisation bei 19°.

Nr.	Glucosid + Zucker	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	Spaltung %	$k \cdot 10^4$	Mittel
1.	0,025 n-Salicin	0,0	[−0,58]		—	—	
		2,3	−0,572	0,01			
		11,7	−0,53	0,05	5,7	22,2	22,8
		24,4	−0,48	0,10	11,4	21,7	
		33,5	−0,43	0,15	17,1	24,5	
2.	0,025 n-Salicin + 0,055 n-α-Glucose	0,0	[+0,03]		—	—	
		2,0	+0,04	0,01	—		
		12,3	+0,083	0,053	6,1	22,8	22,8
		21,7	+0,123	0,093	10,6	22,8	
		35,0	+0,175	0,145	16,5	22,6	
3.	0,025 n-Salicin + 0,055 n-β-Glucose	0,0	[+0,028]	—	—	—	
		2,6	+0,038	0,01	—		
		11,8	+0,070	0,042	4,8	18,7	18,0
		22,0	+0,098	0,070	8,0	16,8	
		30,7	+0,135	0,107	12,2	18,6	
4.	0,025 n-Helicin	0,0	[−0,638]	—	—	—	
		2,5	−0,601	0,037			
		9,8	−0,490	0,148	15,8	77	74
		15,3	−0,413	0,225	24,0	78,5	
		23,2	−0,360	0,278	29,8	66,5	
5.	0,025 n-Helicin + 0,055 n-α-Glucose	0,0	[+0,053]	—	—		
		1,8	+0,075	0,022	—	—	
		8,2	+0,180	0,127	13,6	78	73
		14,9	+0,265	0,212	22,7	75,5	
		21,7	+0,310	0,257	27,5	64,5	
6.	0,025 n-Helicin + 0,055 n-β-Glucose	0,0	[+0,061]	—			
		2,0	+0,090	0,029			
		8,5	+0,173	0,112	12,0	66	59
		15,5	+0,230	0,169	18,1	56,5	
		22,3	+0,290	0,229	24,5	55	

Helicins eine solche von 0,935°. Nach den in der Tabelle angeführten Zeiten wurden nämlich Proben von 10 ccm in 6 ccm 1 proz. Sublimatlösung eingetragen und von der entstandenen Fällung abfiltriert. Die polarimetrischen Ablesungen erfolgten nach 3 Stunden im 2-dm-Rohr.

Zeitschrift für physiologische Chemie **129**, S. 33 [1923].

83. ÜBER DIE EINHEITLICHE NATUR DER β-GLUCOSIDASE DES EMULSINS.

Von RICHARD WILLSTÄTTER, RICHARD KUHN und HARRY SOBOTKA.

Vierte[1] Mitteilung über Spezifität der Enzyme.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und RICHARD KUHN.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Der Redaktion zugegangen am 23. April 1923.

Die erste Untersuchung von R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI, „Zur Kenntnis des Emulsins"[2], hat zu dem Ergebnis geführt, daß es sich bei der Hydrolyse von Amygdalin, Prunasin, β-Methylglucosid, von Lactose und von Raffinose um Wirkungen von Enzymen handelt, die „voneinander unabhängig und in veränderlichen Verhältnissen gemengt auftreten". In einer zweiten Mitteilung haben R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER[3] die quantitative Analyse der Emulsinwirkungen auf Helicin, Salicin, β-Phenylglucosid, Arbutin und β-Methylglucosid ausgedehnt. Die einzige Regelmäßigkeit, durch die sich die Beschreibung des Enzymgemisches vereinfachte, war die Konstanz der auf Helicin bezogenen Zeitwertquotienten für Salicin und β-Phenylglucosid.

Bemerkenswert erschien die Verschiedenheit der Fermente, welche die Natur zum Abbau der aromatischen und [34] des aliphatischen Glucosids ausbildet. Immerhin versprach diese Vorstellung eine einfachere Beschreibung der Tatsachen als die Annahme, daß das Emulsin von Pflanze zu Pflanze und von Präparat zu Präparat verschieden sei. Das in den meisten Fällen nur in den Grenzen von 300 bis 600 schwankende Verhältnis

Zeitwert für β-Methylglucosid: Zeitwert für Helicin

[1] III. Mitteilung: R. KUHN, Diese Zs. Bd. 127, S. 234 [1923].
[2] Diese Zs. Bd. 117, S. 172 [1921] (*Abh.* 77).
[3] Diese Zs. Bd. 121, S. 183 [1922] (*Abh.* 78).

erreichte bei einem aus Zwetschgenkernen[1] isolierten Präparat den Wert 2930. Bei Prunasin und Arbutin überschritten dagegen die Schwankungen das Verhältnis 1:1,8 bzw. 1:3 nicht.

Den Schlußfolgerungen, die aus den Zeitwertmessungen der angeführten Arbeiten gezogen wurden, liegt die Annahme zugrunde, daß die für verschiedene Mengen einer bestimmten Enzymlösung geltende Beziehung

$$\frac{\text{Enzymmenge}}{\text{Enzymwert}} = c \qquad (1)$$

nicht nur unabhängig von der Herkunft und dem Reinheitsgrade des angewandten Ferments überhaupt zutrifft, sondern, daß auch der numerische Wert von c derselbe ist bei verschiedenen pflanzlichen Ausgangsstoffen, bei Präparaten von ungleichem Reinheitsgrade und ungleichem Alter[2]. Die Berechtigung dieser Annahme läßt sich heute nur dadurch prüfen, daß man die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von den wichtigsten Faktoren in jedem Falle ermittelt und mit einander vergleicht. Dieser Vergleich ist für das Rohrzucker spaltende Enzym der Hefe in der II. Mitteilung „Über Spezifität der Enzyme" gezogen worden[3]. Er hat zur Erkenntnis geführt, daß die wechselnde Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Konzentration des [35] Substrates, die wechselnde Affinität des Invertins zum Rohrzucker, der Hauptgrund für die Nichtgiltigkeit der Gleichung (1) ist. Unter den Bedingungen der Zeitwertmessung sind wechselnde Bruchteile der vorhandenen Fermentmengen an das Substrat gebunden und katalytisch wirksam. Der wirksame Anteil des Enzyms ist aber abhängig von der Natur der Substrate, zu denen der Katalysator weit differierende Affinitäten besitzen kann. Dadurch ist es bedingt, daß eine prozentisch gleiche Änderung zweier Affinitäten, wie sie etwa durch einen das Enzym bindenden Stoff verursacht wird, die Spaltungsgeschwindigkeit der beiden entsprechenden Stoffe in ungleichem Maße beeinflussen kann. Die Schwankungen des Saccharase-Raffinase-Quotienten haben in der um mehr als eine Zehnerpotenz verschiedenen Affinität des Invertins zu Saccharose und Raffinose und in seiner von Hefe zu Hefe wechselnden Affinität zu den einzelnen Substraten ihre Erklärung gefunden.

Die Übereinstimmung der in Tab. 5 von R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER[1]) zusammengestellten Zeitwertquotienten für Helicin, Salicin und β-Phenylglucosid und ihre unverkennbare Parallelität für Mandelnitril- und β-Methyl-glucosid ließ es möglich erscheinen, daß ein Enzym zur Spaltung dieser Stoffe befähigt sei, wenn seine Affinität zu den aromatischen Abkömmlingen des Traubenzuckers größer

[1] Präp. c der vorliegenden Mitteilung.

[2] Ausführlicher ist die Beziehung der Zeitwerte zu den Enzymmengen erörtert in der I. Mitteilung dieser Untersuchungsreihe „Zur Theorie der Zeitwertquotienten" von R. KUHN, Diese Zs. Bd. 125, S. 1 [1922/23]; siehe auch R. KUHN „Über die spezifische Natur und den Wirkungsmechanismus kohlehydrat- und glykosidspaltender Enzyme", Die Naturwissenschaften 1923 (*Abh.* 7).

[3] Diese Zs. Bd. 125, S. 28 [1922/23].

[1]) A. a. O., und zwar S. 194.

ist als die zum nichtaromatischen Derivat des Benzaldehydcyanhydrins und letztere wiederum jene zum Derivate des Methylalkohols übertrifft.

Diese Vermutung wird in der vorliegenden Untersuchung durch das Verhalten verschiedener Emulsinpräparate zu Salicin, β-Phenylglucosid, Helicin und β-Methylglucosid in vollem Maße bestätigt gefunden.

Entsprechend den von R. WILLSTÄTTER und R. KUHN[2] vorgeschlagenen Maßeinheiten für Enzyme sollen Konzentration und Ausbeute in den aus den Samen der Prunaceen und Pomaceen gewonnenen Enzympräparaten ausgedrückt werden [36] durch das mit 1000 multiplizierte Reziproke der bisher geltenden Zeitwerte. Bei Messung der durch die Hydrolyse von Salicin gekennzeichneten „Hauptwirkung"[1]) ist z. B. jene Enzymmenge als

β-Glucosidaseeinheit (β-Gl.E.) zu betrachten, die bei 30° und optimalem p_H (4,4) in einer Minute 20 ccm 0,02n[2])-Salicinlösung zu 50% spaltet.

Der β-Glucosidasewert (β-Gl.W.) ist die in 1 g Trockenpräparat enthaltene Anzahl von Glucosidaseeinheiten.

Es beträgt z. B. der β-Gl.W. einer im folgenden analysierten Probe von bitteren Mandeln 0,141, derjenige eines nach dem Verfahren von R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI aus süßen Mandeln gewonnenen Präparates (Zeitwert 25 Minuten für Amygdalin) 2,59. Dieses gibt, verglichen mit einem von E. MERCK bezogenen Emulsin, die größten Ausschläge für den Quotienten Salicin: Methylglucosid, der im ersten Fall 129, im anderen 56 beträgt. In Übereinstimmung damit finden wir unter der von L. MICHAELIS und M. L. MENTEN[3]) gemachten Annahme, daß die durch gleiche Enzymmengen in Lösungen von wechselnder Substratkonzentration beobachteten Umsätze den Dissoziationsresten der Enzym-Glucosid-Verbindungen entsprechen, als Dissoziationskonstanten der Glucosidase-Salicin- und der Glucosidase-Methylglucosid-Verbindungen

für das Präp. aus süßen Mandeln:	$K_{Sal} = 0{,}041$	$K_{Me} = 1{,}1$	$Q_{0,02} = 129$,
für Emulsin „Merck":	$K_{Sal} = 0{,}035$	$K_{Me} = 0{,}40$	$Q_{0,02} = 56$.

In allen anderen untersuchten Fällen sind die Schwankungen der Zeitwertquotienten von entsprechenden Schwankungen der scheinbaren Dissoziationskonstanten begleitet und diese Beziehung ist auch erfüllt, wenn man die Hydrolyse des Salicins mit der des β-Phenylglucosids vergleicht. Die Ausschläge der Zeitwertquotienten lassen sich also durch die Divergenz der Affinitäten quantitativ verstehen. Diese [37] Divergenzen dürften nicht auf eine von Emulsin zu Emulsin verschiedene Struktur der aktiven Gruppen zurückzuführen sein. Das ähnliche Verhältnis, in dem bei jedem Enzymmaterial die Einzelaffinitäten zueinander stehen, spricht dafür, daß nur ihre Reaktionsfähigkeit variiert. Sei es, daß von verschiedenen Pflanzen verschiedene

[2] Chem. Ber. Bd. 56, S. 509 [1922/23] (*Abh. 6*).

[1]) Diese Zs. Bd. 125, S. 1, und zwar S. 17 [1922/23].

[2]) An Stelle der von R. WILLSTÄTTER und W. CSÁNYI a. a. O. angegebenen Normalität 0,0196, welche einer 1proz. Amygdalinlösung entsprach.

[3]) Biochem. Zs. Bd. 49, S. 333 [1913].

kolloide Träger für die spezifisch wirksame Gruppe ausgebildet werden, sei es, daß Assoziationen am kolloiden Träger für die Reaktionsfähigkeit von Bedeutung sind, ein und dasselbe Glucosidaseteilchen vermag sowohl die Spaltung der aliphatischen wie der aromatischen Derivate der β-Glucose zu katalysieren.

Experimenteller Teil.

1. Ausführung und Berechnung der Versuche.

Die Spaltungsgeschwindigkeit der β-Glucoside des Salicylalkohols, des Salicylaldehyds, des Phenols und des Methylalkohols wurde polarimetrisch verfolgt. Weil die in der Bestimmungslösung suspendierten Enzympräparate nach Zusatz von Sodalösung schwer filtrierbare Trübungen verursachten, wurde die Enzymwirkung durch Eintragen der bei der Versuchstemperatur von 30° abgemessenen Proben in Sublimatlösung unterbrochen[1]. Bei den angewandten Enzymkonzentrationen genügte ein Sublimatgehalt von 0,4% des Gesamtvolumens zur sofortigen und vollständigen Inaktivierung. Das Drehungsvermögen der von den Sublimatfällungen abfiltrierten Lösungen wurde nach beendeter Mutarotation der β-Glucose, frühestens 3 Stunden nach Sistierung der Hydrolyse, im Mittel von 6 Ablesungen mit einer Genauigkeit von $\pm 0{,}005$ bis $\pm 0{,}01°$ im 2 dm- oder 4 dm-Rohr bestimmt. Die Zahlen der Tab. 3ff. bezeichnen das Drehungsvermögen, das nach Berücksichtigung der optischen Aktivität der jeweils verwendeten Fermentmengen vor dem Verdünnen mit der Quecksilberlösung bei $l = 4$ dm[2] zur Beobachtung gelangt wäre. Der Berechnung der in den [38] Bestimmungslösungen herrschenden Konzentration der Substrate legten wir die für Versuchsbeginn extrapolierten Drehungen zugrunde.

Nur bei Salicin und β-Methylglucosid wurde die aus der Literatur bekannte Abhängigkeit der $[\alpha]_D$-Werte von der Konzentration berücksichtigt.

Salicin:	$[\alpha]_j = -(65{,}17 - p \cdot 0{,}63)°$ [1]).	
Helicin:	$[\alpha]_D = -60{,}43°$	(für $p = 1{,}4\%$)[2]),
β-Phenylglucosid:	$[\alpha]_D = -71{,}9°$	(für $p = 2$ bis $2{,}5\%$)[3]),
β-Methylglucosid:	$[\alpha]_D = -32{,}25°$	(für $p = 1\%$),
	$[\alpha]_D = -31{,}85°$	(für $p = 8\%$)[4]).

Vom Ferment waren in 20 ccm Reaktionsgemisch enthalten:

bei der Hydrolyse von Salicin	10	mg
Helicin	2	,,
Phenylglucosid	40	,,
Methylglucosid	100	,,

Dadurch wurde erreicht, daß bei den verschiedenen Substraten gleiche Umsätze in Zeiten erzielt wurden, die sich durchschnittlich wie 1:1:3:10 verhielten. Der für die einzelnen Substrate differierende zeitliche Verlauf des Umsatzes machte es er-

---

[1] Nach R. KUHN, Chem. Ber. Bd. 56, S. 857, und zwar S. 859f. [1923].
[2] Im Falle der Methylglucosidspaltungen bei $l = 2$ dm.
[1]) O. HESSE, Liebigs Ann. der Chem. Bd. 176, S. 89, und zwar S. 116 [1874/75].
[2]) R. WEGSCHEIDER in F. TIEMANN, Chem. Ber. Bd. 18, S. 1595, und zwar S. 1600 [1885].
[3]) E. FISCHER und L. v. MECHEL, Chem. Ber. Bd. 49, S. 2813, und zwar S. 2816 [1916].
[4]) W. A. VAN EKENSTEIN, Rec. trav. chim. Pays-Bas Bd. 13, S. 183, und zwar S. 185 [1894].

forderlich, die für eine Reaktion erster Ordnung berechneten Reaktionskonstanten für Versuchsbeginn zu extrapolieren. Diese Zahlen, mit der Normalität der Glucosidlösungen multipliziert, wurden mit L. MICHAELIS und M. L. MENTEN als Dissoziationsreste der Glucosidase-Glucosid-Verbindungen gedeutet. Es zeigte sich dabei, daß aus experimentellen Gründen durchwegs nur $^1/_2$ bis $^2/_3$ der bei dissoziationsfreier Bindung des Enzyms zu erwartenden Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht werden können. Der weiteren Verfolgung der pS-Kurven wird nämlich in diesem Gebiete bei Salicin, Helicin und [39] β-Phenylglucosid durch die beschränkte Löslichkeit, beim β-Methylglucosid durch die Viscosität der 20- und mehrprozentigen Lösungen Halt geboten. Wie für Saccharase und Raffinase wird aus diesem Grunde die scheinbare Dissoziationskonstante rechnerisch ermittelt und zwar durch Probieren, welcher Parameter die Neigung der Kurve am besten widergibt. Die in den konzentriertesten Lösungen beobachteten Abweichungen, die durchwegs zu geringe Dissoziationsreste ergaben, blieben dabei unberücksichtigt. Der mögliche Fehler eines aus 5 bis 6 Versuchen berechneten Parameters ergibt sich zu $\pm 20\%$, während der wahrscheinliche Fehler der K_S-Werte 5 bis 10% beträgt.

Tabelle 1.
β-Glucosidasewerte einiger Prunaceensamen und Emulsinpräparate.
Hydrolysen bei 30° und optimalem p_H; 0,02 n-Glucosidlösungen; Mittelwerte aus je 4 Bestimmungen.

Enzym	Glucosidasewert für			
	Helicin (p_H = 5,3)	Salicin (p_H = 4,4)	β-Phenylglucosid (p_H = 5,0)	β-Methylglucosid (p_H = 4,4)
a Bittere Mandeln	1,04	0,141	0,0115	0,00147
b Emulsin „Merck“	2,93	0,532	0,0556	0,0094
c Aprikosenkerne	0,346	0,063	—	0,00061
d Präp. aus süßen Mandeln	—	2,59	—	0,0201
e Pflaumenkerne (1921)	0,647	0,136		0,00120
f „ (1922)	0,975	0,173	—	0,00159
g Kirschenkerne	1,97	0,337	—	0,00258

2. Das untersuchte Enzymmaterial.

Für den Vergleich der Affinitäten und der Geschwindigkeitsquotienten dienten:

a) ein aus bitteren Mandeln (Prunus Amygdalus var. am.) gewonnenes, entöltes Pulver, Nr. 2 der Tab. 4 und 5 von R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER, 14 Monate alt, β-Gl.W. = 0,141 für Salicin;

[40] b) Emulsin „Merck“, Nr. 9 der angeführten Tabellen, β-Gl.W. = 0,532;

c) ein aus Aprikosenkernen (Prunus armeniaca; 1922) dargestelltes, in üblicher Weise von Öl befreites Produkt, β-Gl.W. = 0,063;

d) das von WILLSTÄTTER und OPPENHEIMER aus süßen Mandeln isolierte Präparat Nr. 8, β-Gl.W. = 2,59;

e) und f) zwei aus Pflaumen der Ernten 1921[1] bzw. 1922 gewonnene Emulsinpräparate, sowie

[1] Präp. Nr. 4 der zweiten Mitteilung über Emulsin.

g) ein aus den Samen von Prunus avium (1922) isoliertes glucosidasereiches Rohprodukt.

Tabelle 2. Quotienten der Glucosidasewerte.

Enzym	$\frac{\text{Helicin}}{\text{Salicin}}$	$\frac{\text{Salicin}}{\beta\text{-Phenylgluc.}}$	$\frac{\text{Salicin}}{\beta\text{-Methylgluc.}}$
a Bittere Mandeln	7,4	12,3	96
b Emulsin „Merck"	5,5	9,6	56
c Aprikosenkerne	5,5		103
d Präp. Nr. 8	—	—	129
e Pflaumenkerne (1921)	4,8	—	113
f „ (1922)	5,6		100
g Kirschenkerne	5,8		130

Wie aus Tab. 2 zu ersehen ist, ergeben sich die größten Ausschläge für die Quotienten bei den Präparaten *a* bis *d*. Die Präparate *e* bis *g* stimmen mit den voranstehenden so weitgehend überein, daß sie zur folgenden Betrachtung der Affinitätsverhältnisse nicht herangezogen wurden.

3. Die Affinitäten der β-Glucosidase.

In den folgenden Tabellen sind die bei wechselnder Substratkonzentration durch gleiche Enzymmengen bewirkten Drehungszunahmen verzeichnet. Die erste Spalte

[41]

Tabelle 3.

Wirkung der bitteren Mandeln *a* auf Salicinlösungen wechselnder Konzentration.

$K_{Sal} = 0{,}035$.

[*Sal*] (1~)	−log [*Sal*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	$k \cdot 10^6$ / $k \cdot 10^6 \cdot [Sal]$	100 g ber.	100 g gef.	Δ
0,0985	1,01	0	— 7,135	—	292	73,8	(53,3)	(—20,5)
(10,86°)		40	— 7,845	0,29				
		94,5	— 6,465	0,67	28,8			
		160	6,145	0,99				
0,047	1,33	0	— 3,46	—	656	57,3	57,0	— 0,3
(5,24°)		40	— 3,17	0,29				
		95	— 2,85	0,61	30,8			
		160	— 2,53	0,93				
		323	— 1,79	1,67				
0,032	1,50	0	— 2,37	—	864	47,7	51,2	3,5
(3,58°)		40	— 2,11	0,26				
		95,5	— 1,82	0,55	27,7			
		160	— 1,535	0,835				
		324	— 1,895	1,475				
0,0222	1,65	0	— 1,65	—	887	38,4	36,4	— 2,0
(2,49°)		60	— 1,385	0,275				
		180	— 0,91	0,74	19,7			
		333,5	— 0,485	1,165				
0,0125	1,90	0	— 0,935	—	1142	26,3	26,5	+ 0,2
(1,41°)		60	— 0,705	0,23				
		180	— 0,42	0,505	14,3			
		333	— 0,175	0,76				
0,0080	2,10	0	— 0,595	—	1222	18,6	18,3	— 0,3
(0,895°)		60	— 0,46	0,135				
		181	— 0,265	0,33	9,8			
		336,5	— 0,09	0,505				

[42] Tabelle 4. Wirkung von Emulsin „Merck“ *b* auf Salicin.

$K_{Sal} = 0{,}035$.

[*Sal*] (Δ_∞)	−log [*Sal*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungszunahme (°)	$k \cdot 10^6$ / $k \cdot 10^6 \cdot [Sal]$	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,0975	1,01	0	— 7,07	—	1230	73,6	(58,2)	(— 15,4)
(10,75°)		50	— 5,695	1,375				
		100	— 4,35	2,72	**120**			
		170	— 3,07	4,00				
		367	+ 0,00	7,07				
0,049	1,31	0	— 3,615	—	2460	58,3	58,4	+ 0,1
(5,47°)		50	— 2,24	1,375				
		100	— 1,28	2,335	**120,5**			
		170	— 0,385	3,23				
		367	+ 0,895	4,52				
0,0324	1,49	0	— 2,40	—	3040	48,1	47,8	— 0,3
(3,625°)		50,5	— 1,345	1,055				
		100	— 0,545	1,855	**98,5**			
		170	+ 0,16	2,56				
		368	+ 0,895	3,295				
0,0216	1,67	0	— 1,605	—	3600	38,2	37,6	— 0,6
(2,42°)		84,5	— 0,385	1,22				
		184,5	+ 0,285	1,89	**77,8**			
		387,5	+ 0,615	2,22				
0,0135	1,87	0	— 1,01	—	4350	27,8	28,4	+ 0,6
(1,52°)		81	— 0,175	0,845				
		185	+ 0,21	1,22	**58,7**			
		389	+ 0,33	1,34				
0,0095	2,02	0	— 0,705	—	4650	21,3	21,4	+ 0,1
(1,065°)		80,5	0,09	0,615				
		186	+ 0,11	0,815	**44,2**			
		390	+ 0,22	0,925				

gibt die Normalität der Glucosidlösungen sowie die daraus für 100proz. Spaltung errechneten Drehungszunahmen an. Aus der zweiten [44] Spalte sind die negativ genommenen Briggschen Logarithmen der Substratkonzentration zu entnehmen. Die Reaktionskonstanten der sechsten Kolumne sind Mittelwerte der aus den einzelnen Beobachtungsdaten gewonnenen Zahlen. Es kam jedoch in einzelnen Versuchsreihen vor, daß die Konstanten im Verlaufe der Reaktion allmählich abfielen. In diesen Fällen sind die für Versuchsbeginn extrapolierten Werte verzeichnet. Die mit der Substratkonzentration multiplizierten Reaktionskonstanten (fettgedruckte Zahlen der sechsten Kolumne) wurden den [45] Dissoziationsresten ϱ (7. Spalte) möglichst angeglichen. Vorzeichen und Größe der Differenz Δ zwischen den theoretischen und beobachteten, mit 100 multiplizierten Werten ist in der letzten Kolumne angegeben.

Die in den Tab. 3, 4 und 5 für bittere Mandeln, für Mercksches Emulsin und für Aprikosenkerne ermittelte Konzentration der Salicinlösungen, in denen die Hälfte des maximal zu erwartenden Umsatzes beobachtet wurde, stimmen innerhalb der Versuchsfehler überein. Die für K_{Sal} berechneten Werte 0,035, 0,035 und 0,042 zeigen, daß das Emulsin zum Glucosid des Salicylalkohols ähnliche Affinität besitzt, wie die Saccharase des Hefepilzes zum Rohrzucker. Die doppelt so große Affinität, welche

[43] Tabelle 5. Salicinhydrolyse durch Aprikosenkerne *c*.

K_{Sal} = **0,041**.

[*Sal*] (A_∞)	− log [*Sal*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	$k \cdot 10^6$ / $k \cdot 10^6 \cdot [Sal]$	100 *ϱ* ber.	100 *ϱ* gef.	*Δ*
0,0972 (10,72°)	1,01	0	— 7,04	—	201	70,3	70,6	+ 0,3
		85	— 6,625	0,415				
		230	— 6,08	0,96	**19,6**			
		380	— 5,63	1,41				
0,0461 (5,315°)	1,34	0	— 3,39	—	318	53,0	53,0	± 0,0
		85	— 3,105	0,285				
		230	— 2,655	0,735	**14,7**			
		381	— 2,305	1,095				
0,0298 (3,335°)	1,53	0	— 2,21	—	392	42,1	42,0	— 0,1
		85	— 1,95	0,26				
		230	— 1,60	0,61	**11,7**			
		380	— 1,25	0,96				
		578,5	— 0,96	1,25				
0,0205 (2,335°)	1,68	0	— 1,54	—	433	33,3	32,3	— 1,0
		110	— 1,255	0,285				
		395	— 0,79	0,76	**8,97**			
		593,5	— 0,57	0,97				
0,0129 (1,46°)	1,89	0	— 0,97	—	534	24,0	24,8	+ 0,8
		110	— 0,75	0,18				
		395	— 0,45	0,52	**6,98**			
		589	— 0,30	0,67				
0,0083 (0,93°)	2,08	0	— 0,615	—	575	16,8	17,2	+ 0,4
		111	— 0,47	0,145				
		396	— 0,265	0,35	**4,77**			
		598	— 0,14	0,475				

[44] Tabelle 6.

Salicinhydrolyse durch Präparat *d* aus süßen Mandeln.

K_{Sal} = **0,017**.

1,2 mg statt 10 mg Enzym in 20 ccm.

[*Sal*] (A_∞)	− log [*Sal*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	$k \cdot 10^6$ / $k \cdot 10^6 \cdot [Sal]$	100 *ϱ* ber.	100 *ϱ* gef.	*Δ*
0,101 (11,17°)	1,00	0	— 7,35	—	615	85,5	(77,7)	— 7,8
		10	— 7,17	0,18				
		26	— 6,94	0,41	**62,1**			
		62	— 6,72	0,63				
0,0514 (5,72°)	1,29	0	— 3,78	—	1160	75,2	74,6	— 0,6
		10	— 3,63	0,15				
		25	— 3,41	0,37	**59,7**			
		60	— 3,20	0,58				
0,0245 (2,74°)	1,61	0	— 1,81	—	1960	59,0	60,0	+ 1,0
		10	— 1,64	0,17				
		25	— 1,54	0,27	**48,0**			
		60,5	— 1,32	0,49				
0,0139 (1,56°)	1,86	0	— 1,03	—	2590	45,0	45,0	± 0,0
		25,5	— 0,81	0,22				
		60	— 0,64	0,39	**36,0**			
0,0048 (0,54°)	2,32	0	— 0,36	—	—	—	—	—
		15	— 0,42	0,12				
		45	— 0,15	0,21				

nach Tab. 6 unserem Enzym aus süßen Mandeln zukommt, ist bedingt durch die 8mal geringere Fermentmenge, die bei den entsprechenden Versuchen angewandt wurde. Weit mehr als im System Saccharase-Rohrzucker ist nämlich bei der Spaltung der β-Glucoside der Parameter der Aktivitäts-pS-Kurve abhängig von der Menge des Enzymmaterials, wie es die nach B. Helferich[1] nicht erfüllte Proportionalität von Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit erwarten ließ. In unseren Versuchen bewirkten zwar vom Emulsin „Merck" Mengen, die sich wie 1:25 erhielten, in 0,1 n-Salicinlösung Spaltungsgeschwindigkeiten, die in genau gleichem Verhältnis standen, aber aus dem Verhältnis der Reaktionskonstanten, die in nur 0,0187 und 0,044 n-Lösungen bei Anwendung der Aprikosenkerne gefunden wurden, berechnen wir für

2 mg Enzym $K_{Sal} = 0{,}022$,
10 mg Enzym $K_{Sal} = 0{,}033$.

Der unter Anwendung von 1,2 mg erhaltene Wert 0,017 der Tab. 6 dürfte demnach bei der in allen anderen Fällen benützten Menge von 10 mg in Übereinstimmung mit den übrigen Werten 0,04 betragen.

Tabelle 7.

[46] Spaltung von β-Phenylglucosid durch bittere Mandeln *a*.

$K_{Ph} = 0{,}065$.

$[Ph]$ (1 dm)	-log $[Ph]$	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungszunahme (°)	$k \cdot 10^6$ / $k \cdot 10^6 \cdot [Ph]$	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,0638 (7,11°)	1,20	0	— 4,70	—	231	49,5	51,7	+ 2,2
		151	— 4,16	0,54				
		267	— 3,71	0,99	14,7			
		398	— 3,33	1,37				
0,0393 (4,39°)	1,40	0	— 2,90	—	270	37,7	37,3	— 0,4
		131	— 2,59	0,31				
		240	— 2,30	0,60	10,6			
		410	— 1,89	1,01				
0,0225 (2,51°)	1,65	0	— 1,66	—	301	25,7	23,9	— 1,8
		131	— 1,50	0,16				
		240	— 1,31	0,35	6,77			
		410	— 1,02	0,64				
0,0152 (1,69°)	1,82	0	— 1,12	—	352	19,0	18,9	— 0,1
		135	— 0,97	0,15				
		305	— 0,75	0,37	5,35			
		546	— 0,49	0,63				
0,0094 (1,04°)	2,03	0	— 0,69	—	391	12,6	12,9	+ 0,3
		135	— 0,59	0,10				
		305	— 0,44	0,25	3,67			
		546	— 0,25	0,44				
0,0057 (0,64°)	2,24	0	— 0,42	—	533	8,2	9,9	+ 1,7
		136	— 0,34	0,08				
		305	— 0,22	0,20	3,10			
		546	— 0,09	0,33				

[1] Diese Zs. Bd. 117, S. 159 [1921].

[47] Tabelle 8. β-Phenylglucosid gegen Emulsin „Merck“ *b*.

K_{Ph} = 0,040.

[*Ph*] (A_∞)	− log [*Ph*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	k · 10⁶ / k · 10⁶ · [*Ph*]	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,0649	1,19	0	— 4,78	—	84	61,9	61,7	— 0,2
(7,23°)		63	— 3,95	0,83				
		106	— 2,98	1,80	**54,5**			
		218	— 1,41	3,37				
0,0401	1,40	0	— 2,96	—	108	50,1	49,1	— 1,0
(4,48°)		63	(— 2,43)	(0,53)				
		105	— 1,89	1,07	**43,3**			
		219	— 0,86	2,10				
0,0252	1,60	0	— 1,86	—	141	38,6	40,0	+ 1,4
(2,81°)		63	— 1,43	0,52				
		105	— 0,99	0,87	**35,4**			
		218	— 0,38	1,48				
0,0175	1,76	0	— 1,29	—	158	30,4	31,1	+ 0,7
(1,95°)		95	— 0,73	0,56				
		230	— 0,23	1,06	**27,5**			
		354	+ 0,04	1,33				
0,0118	1,93	0	— 0,87	—	164	22,8	22,1	— 0,7
(1,32°)		95	— 0,48	0,39				
		350	— 0,03	0,84	**19,4**			
0,0072	2,14	0	— 0,53	—	132	15,2	(10,8)	(— 4,4)
(0,80°)		95	— 0,33	0,20				
		350	± 0,00	0,53	**9,5**			

Nur wenig geringer ist die Affinität der Glucosidase zum Glucosid des Phenols. Wie aus den Tab. 7 und 8 hervorgeht, ergeben sich hier bereits Unterschiede, welche die Fehlergrenzen der Affinitätsmessung übersteigen. Entsprechend den K_{Ph}-Werten von 0,040 und 0,065 verhält sich die Affinität der bitteren Mandeln zu jener des käuflichen Emulsins wie 3 zu 5.

[48] Tabelle 9. β-Methylglucosidspaltung durch Präparat *a*.

K_{Me} = 0,60.

[*Me*] (A_∞)	− log [*Me*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	k · 10⁶ / k · 10⁶ · [*Me*]	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,706	0,15	0	— 9,19	—	33,3	54,1	(37,8)	(— 16,3)
(22,54°)		120	— 8,98	0,21				
		240	— 8,79	0,40	**23,5**			
		360	— 8,57	0,62				
0,590	0,23	0	— 7,69	—	53,8	49,6	50,6	+ 1,0
(18,85°)		120	— 7,43	0,26				
		240	— 7,14	0,55	**31,7**			
		360	— 6,86	0,83				
		780	— 5,85	1,84				
0,331	0,48	0	— 4,31	—	67,6	35,5	36,0	+ 0,5
(10,57°)		184	— 4,02	0,29				
		360	— 3,72	0,59	**22,4**			
		540	— 3,45	0,86				
		797	— 3,08	1,23				

Tabelle 9. (Fortsetzung.)

[Me] (A_∞)	− log [Me]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	k · 10⁶ / **k · 10⁶ · [Me]**	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,200 (6,40°)	0,70	0	— 2,62	—	75,7	25,0	24,5	— 0,5
		184	— 2,43	0,19				
		360	— 2,25	0,37	**15,1**			
		540	— 2,01	0,61				
		799	— 1,83	0,79				
0,130 (4,16°)	0,88	0	— 1,71	—	82,4	17,7	17,2	— 0,5
		184	— 1,55	0,16				
		505	— 1,35	0,35	**10,7**			
		787	— 1,15	0,56				
0,0775 (2,47°)	1,11	0	— 1,02	—	95,5	11,4	11,8	+ 0,4
		240	— 0,89	0,13				
		505	— 0,75	0,27	**7,4**			
		793	— 0,64	0,38				
0,046 (1,47°)	1,33	0	— 0,60	—	97,3	7,1	7,2	+ 0,1
		240	— 0,54	0,06				
		505	— 0,44	0,16	**4,5**			

[49] Tabelle 10. β-Methylglucosid; Emulsin „Merck" b.

K_{Me} = 0,40.

[Me] (A_∞)	− log [Me]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	k · 10⁶ / **k · 10⁶ · [Me]**	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,69 (22,025°)	0,16	0	— 8,985	—	279	63,3	66,5	+ 3,2
		123	— 7,11	1,875				
		240	— 5,91	3,075	**192,5**			
		359	— 4,85	4,135				
0,474 (15,14°)	0,32	0	6,18		312	54,2	51,4	— 2,8
		127	— 4,865	1,315				
		240	— 3,685	2,495	**149**			
		361	— 2,855	3,325				
0,317 (10,12°)	0,50	0	— 4,13	—	393	44,2	43,1	— 1,1
		180	— 2,50	1,63				
		360	— 1,345	2,785	**124,5**			
		540	— 0,42	3,71				
0,189 (6,035°)	0,72	0	— 2,465	—	515	32,1	33,9	+ 1,8
		180	— 1,25	1,215				
		360	— 0,355	2,11	**97,5**			
		540	+ 0,335	2,80				
0,147 (4,705°)	0,83	0	— 1,92	—	588	26,9	29,8	+ 2,9
		241	— 0,545	1,385				
		480	+ 0,22	2,14	**86,5**			
		1493	(+ 1,87)	(3,79)				
0,076 (2,47°)	1,12	0	— 1,03	—	624	16,0	16,2	+ 0,2
		240	— 0,29	0,74				
		479	+ 0,17	1,20	**47,5**			
		1492	(+ 1,355)	(2,385)				
0,0565 (1,805°)	1,25	0	— 0,74	—	604	12,4	11,7	— 0,7
		240	— 0,23	0,51				
		479	+ 0,14	0,88	**34**			
		1492	(+ 0,925)	(1,665)				

[50] Tabelle 11. β-Methylglucosidhydrolyse durch Aprikosenemulsin *c*.

$K_{Me} = 0{,}65$.

[*Me*] (A_{∞})	− log [*Me*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	$k \cdot 10^6$ / $k \cdot 10^6$ [*Me*]	100 φ ber.	100 φ gef.	Δ
0,78 (24,91°)	0,11	0	− 10,16	—	21,5	54,6	(49,3)	(− 5,3)
		245	− 9,81	0,35				
		919	− 9,105	1,055	**16,8**			
		1489	− 8,59	1,57				
0,487 (15,56°)	0,31	0	− 6,35	—	30,4	42,8	43,4	+ 0,6
		245	(− 6,20)	(0,33)				
		919	− 5,34	1,01	**14,8**			
		1489	− 5,00	1,35				
0,386 (12,33°)	0,41	0	− 4,985	—	31,6	37,2	35,8	+ 1,4
		450	− 4,575	0,41				
		1230	− 3,95	1,035	**12,2**			
		1650	− 3,615	1,37				
0,228 (7,28°)	0,64	0	− 2,93	—	35,1	25,9	23,5	− 2,4
		450	− 2,705	0,225				
		1230	− 2,21	0,72	**8,01**			
		1650	− 2,04	0,89				
0,156 (4,98°)	0,81	0	− 1,985	—	44,0	19,3	20,1	− 0,8
		644	− 1,665	0,32				
		1230	− 1,375	0,61	**6,86**			
		1650	− 1,27	0,715				
0,098 (3,13°)	1,01	0	− 1,23	—	50,1	13,1	14,3	+ 1,2
		644	− 1,015	0,215				
		1424	− 0,72	0,51	**4,91**			
		2430	− 0,48	0,75				
0,067 (2,145°)	1,17	0	− 0,83	—	39,2	9,3	7,8	− 1,5
		644	− 0,71	0,12				
		1424	− 0,57	0,26	**2,63**			
		2432	− 0,145	0,415				

[51] Tabelle 12.

β-Methylglucosid und Präparat aus süßen Mandeln *d*.

$K_{Me} = 1{,}12$.

Je 40 mg statt 100 mg Enzym in 20 ccm.

[*Me*] (A_{∞})	− log [*Me*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-zunahme (°)	$k \cdot 10^6$ / $k \cdot 10^6 \cdot$ [*Me*]	100 φ ber.	100 φ gef.	Δ
0,808 (25,55°)	0,09	0	− 10,35	—	315	41,9	41,9	± 0,0
		22	− 9,90	0,45				
		54,5	− 9,38	0,97	**254**			
		68	− 9,22	1,13				
0,317 (10,12°)	0,50	0	− 4,125	—	419	22,1	22,1	± 0,0
		73	− 3,14	0,985				
		274	− 1,77	2,355	**133**			
0,196 (6,27°)	0,71	0	− 2,57	—	450	14,9	14,7	− 0,2
		77,5	− 2,08	0,45				
		109	− 1,855	0,715	**88,2**			
0,081 (2,59°)	1,09	0	− 1,06	—	(781)	6,7	(10,6)	(+ 3,9)
		77,5	− 0,69	0,37				
		235,5	− 0,245	0,815	**63,5**			
0,020 (0,64°)	1,70	0	− 0,26	—	563	1,8	1,9	+ 0,1
		246	− 0,08	0,18				
		482	+ 0,03	0,29	**11,3**			

Genau im nämlichen Verhältnis stehen nun nach Tab. 9 und 10 auch die Affinitäten dieser Präparate zum β-Methylglucosid. Die numerischen Werte von K_{Me} 0,40 und 0,60 zeigen jedoch, daß die Verbindung des Enzyms mit dem aliphatischen Glucosid 10mal stärker dissoziiert ist. Die Affinitätskonstanten $1:K_{Me}$ betragen nur 2,5 bzw. 1,7. Vom letzteren Werte nur unerheblich differierend ist die Zahl 1,5, die wir für das Emulsin der Aprikosenkerne aus Tab. 11 berechnen. Für das aus süßen Mandeln dargestellte gereinigte Präparat (Tab. 12) fällt die Affinitätskonstante bis auf 0,9. Sie ist nur halb so groß als die geringste, welche am System Invertin-Raffinose gemessen wurde.

[52] Tabelle 13. Helicinhydrolyse durch bittere Mandeln *a*.

$[Hel]$ (1α)	$-\log[Hel]$	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungszunahme (°)	$k \cdot 10^5$	$[k] \cdot 10^6 \cdot [Hel]$
0,070	1,15	0	— 5,03	—	[53]	37,1
(7,68°)		30	— 4,80	0,23	44	
0,0442	1,35	0	— 3,18	—	[85]	37,6
(4,85°)		30	— 2,95	0,23	70	
		90	— 2,785	0,395	41	
		170	— 2,56	0,62	35	
0,0282	1,55	0	— 2,03	—	[159]	44,8
(3,095°)		30	— 1,76	0,27	132	
		90	— 1,57	0,46	78	
		171	— 1,375	0,655	60	
0,0184	1,74	0	— 1,32	—	[143]	26,3
(2,015°)		60	— 1,055	0,265	102	
		176	— 0,835	0,485	68	
		300	— 0,595	0,725	64	
0,0122	1,91	0	— 0,88	—	[192]	23,4
(1,34°)		61	— 0,63	0,25	147	
		180	— 0,395	0,485	108	
		300	— 0,21	0,67	100	
0,0074	2,13	0	— 0,53	—	[287]	21,2
(0,81°)		60	— 0,33	0,20	205	
		184	— 0,20	0,33	124	
		300	— 0,045	0,485	132	

Die bei der Hydrolyse von Helicinlösungen gewonnenen Zahlen (Tab. 13 bis 15) gestatten keine Auswertung in bezug auf K_{Hel}. Die in der 6. Spalte von Tab. 13 mitgeteilten Reaktionskonstanten sprechen in Übereinstimmung mit dem Befunde von R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER für eine starke Bindung des freien Enzyms durch das aromatische Spaltprodukt. Abb. 1 stellt die stark ausgeprägten Maxima des Umsatzes (für Versuchsbeginn extrapolierte Reaktionskonstanten × Helicinkonzentration) dar. Sie wurden mit [53] bitteren Mandeln und mit dem Merckschen Präparat in 0,03-, mit dem Aprikosenmaterial in 0,04n-Lösung gefunden. Unsere Kenntnis über die hemmende Wirkung des Salicylaldehyds reicht nicht aus, um aus diesen Kurven auf die Affinitätsverhältnisse zu schließen. Immerhin geht aus der Ähnlichkeit der drei Kurven hervor, daß die scheinbaren Dissoziationskonstanten nicht

Tabelle 14. Emulsin „Merck“ *b* gegen Helicin.

[*Hel*] (A_∞)	– log [*Hel*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungszunahme (°)	$k \cdot 10^5$	$k \cdot 10^5 \cdot [Hel]$
0,064 (7,02°)	1,19	0	— 4,595	—	139	89,0
		20	4,16	0,435		
		45¹/₂	— 3,84	0,755		
		65¹/₂	— 3,615	0,98		
0,0426 (4,70°)	1,37	0	— 3,09	—	178	75,8
		20	— 2,72	0,37		
		45	— 2,40	0,69		
		65¹/₄	2,145	0,945		
0,0280 (3,105°)	1,55	0	— 2,05	—	328	92,0
		20	— 1,615	0,435		
		45	— 1,31	0,74		
		65	— 1,105	0,945		
0,0125 (1,385°)	1,90	0	— 0,90	—	488	61,0
		30	— 0,53	0,38		
		60³/₄	— 0,22	0,69		
		90¹/₄	— 0,055	0,855		
0,0116 (1,27°)	1,94	0	0,835	—	507	57,8
		30	— 0,46	0,375		
		60³/₄	— 0,175	0,66		
		91¹/₂	0,06	0,775		
0,0085 (0,94°)	2,07	0	— 0,62	—	647	55,0
		30	— 0,285	0,335		
		60³/₄	0,08	0,54		
		90¹/₂	+ 0,045	0,665		

[54] Tabelle 15. Einwirkung des Emulsins der Aprikosenkerne *c* auf Helicinlösungen.

[*Hel*] (A_∞)	log [*Hel*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungszunahme (°)	$k \cdot 10^5$	$k \cdot 10^5 \cdot [Hel]$
0,0682 (7,48°)	1,17	0	4,90	—	135	92,1
		90	4,70	0,20		
		225	— 4,48	0,42		
		410	4,22	0,68		
0,0437 (4,79°)	1,36	0	— 3,14	—	251	109,5
		90	— 2,88	0,26		
		225	— 2,69	0,45		
		410	- 2,40	0,74		
0,0259 (2,84°)	1,59	0	— 1,86	—	432	98,9
		90	— 1,60	0,26		
		226	1,41	0,45		
		410	1,15	0,71		
0,0189 (2,08°)	1,72	0	— 1,36	—	483	91,2
		120	1,10	0,26		
		300	0,82	0,54		
		554	(– 0,55)	(0,81)		
0,0114 (1,25°)	1,94	0	— 0,82	—	562	64,1
		120	0,64	0,18		
		300	— 0,41	0,41		
		555	— 0,25	0,57		
0,0074 (0,81°)	2,13	0	— 0,53	—	687	54,0
		120	— 0,39	0,14		
		300	— 0,20	0,33		
		555	— 0,09	0,44		

weit differieren und der Größenordnung nach mit jenen der Glucosidase-Salicin-Verbindungen übereinstimmen dürften.

4. Vergleich der Affinitäten mit den Zeitwertquotienten.

Die im 3. Abschnitt mitgeteilten Versuche zeigen die Mannigfaltigkeit der Affinitätsbeträge, die ein bestimmtes Enzympräparat zu verschiedenen Glucosiden und ein [55] bestimmtes Glucosid zu verschiedenen Fermentpräparaten aufweisen kann.

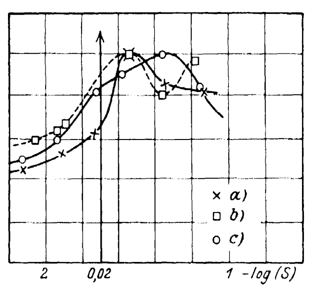


Abb. 1. Relative Wirksamkeit der Emulsinpräparate *a*—*c* auf Helicin.

In Abb. 2 stellen S_b und M_b die für das Mercksche „Emulsin" ermittelten Dissoziationsreste der Salicin- und der β-Methylglucosid-Enzym-Verbindungen dar. Ph_a

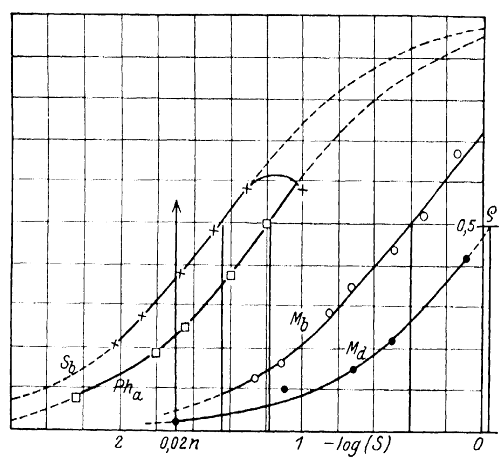


Abb. 2. Dissoziationsreste einiger Emulsin-Glucosid-Verbindungen.

ist die Aktivitätskurve des Rohproduktes *a* aus bitteren Mandeln für [56] β-Phenylglucosid. M_d bezieht sich auf die Methylglucosidasewirkung des aus süßen Mandeln isolierten Ferments.

In solchen Fällen liefert der Vergleich gleicher Bruchteile der maximal möglichen Reaktionsgeschwindigkeiten ein genaueres Bild vom Mengenverhältnis der Enzyme

als die bei einer willkürlich gewählten Substratkonzentration bestimmten Zeitwerte. In Tab. 16 sind aus diesem Grunde neben den in 0,02n-Lösung bestimmten Quotienten $Q_{0,02}$ auch die für unendlich hohe Substratkonzentration extrapolierten Q_{∞} verzeichnet.

Tabelle 16. Scheinbares und wahres Mengenverhältnis der Enzyme.

Enzym	Salicin: β-Phenyl-Gl.		Salicin: β-Methyl-Gl.	
	$Q_{0,02}$	Q_{∞}	$Q_{0,02}$	Q_{∞}
a) Bittere Mandeln	12,3	8,0	96	8,5
b) „Emulsin“ Merck	9,6	8,7	56	7,3
c) Aprikosenkerne	—		103	9,3
d) Präparat aus süßen Mandeln	—	—	129	6,8

Innerhalb der Versuchsfehler von ±20% erweist sich somit nicht nur das Mengenverhältnis der salicin- und phenylglucosidspaltenden, sondern auch das der salicin- und methylglucosidspaltenden Enzyme als konstant. Die zufällige Übereinstimmung der Mittelwerte für Q_{∞}, nämlich 8,3 ± 0,4 und 8,0 ± 1,3, mag dahin interpretiert werden, daß die Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktionszwischenprodukte bei der enzymatischen Hydrolyse von Phenyl- und Methylglucosid die gleichen sind.

Zeitschrift für physiologische Chemie 129, S. 57 [1923].

84. VERGLEICH VON HEFE- UND TAKA-SACCHARASE.

Von RICHARD KUHN.

Fünfte[1] Mitteilung über Spezifität der Enzyme.

Von RICHARD WILLSTÄTTER und RICHARD KUHN.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1923.)

In einer Systematik spezifischer Katalysatorenwirkungen wird die Erscheinung, daß ein bestimmtes System unter dem Einfluß verschiedener Katalysatoren auf verschiedenartigen Wegen wieder denselben Endzustand erreicht, besondere Beachtung verdienen. Für eine solche Konvergenz spezifischer Reaktionswege, die durch den verschiedenartigen Bau der Reaktionszwischenprodukte zu verstehen ist, scheint aber die Literatur nur den folgenden Anhaltspunkt zu bieten.

ARMSTRONG[2] hat beim Vergleich von Mandel- und Hefelactase gefunden, daß die Wirksamkeit der ersteren durch Galaktose mäßig, durch Glucose dagegen stark gehemmt wird, während die der letzteren ausschließlich durch Galaktose beeinflußt wird. In der III. Mitteilung dieser Untersuchungsreihe wurde gezeigt, daß bei allen früheren Untersuchungen über den Einfluß der Spaltprodukte auf kohlehydrat- und glucosidspaltende Fermente ein Faktor von ausschlaggebender [58] Bedeutung unberücksichtigt geblieben ist: die vollkommene Verschiedenheit im Verhalten zu den α- und β-Modifikationen der Zucker. Die wichtige Beobachtung ARMSTRONGS bedarf somit in dieser Hinsicht der Ergänzung. Es ist nicht ausgeschlossen, daß in diesem und ähnlichen Fällen eine verhältnismäßig geringe Affinität zu der einen Hexose für das Zustandekommen der Hydrolyse ausschlaggebend ist, während eine vielfach größere zu dem anderen Spaltprodukt deshalb nicht in Frage kommt, weil sie sich auf jene stereoisomere Form desselben beschränkt, die im Zucker bzw. Glucosid nicht enthalten[1]) ist. Eine weitere Voraussetzung für die Richtigkeit der aus Hemmungsversuchen gezogenen Schlußfolgerungen ist die zuverlässige Kenntnis der Konfiguration

[1] IV. Mitteilung voranstehend.

[2] E. F. ARMSTRONG, Proc. Roy. Soc. Bd. 73, S. 516 [1904].

[1]) So erscheint die Hemmung der Saccharasewirkung durch β-Glucose als belanglos für die Frage nach dem Mechanismus der Rohrzuckerspaltung. Daß die Lactase des Emulsins auch zur

des Substrates, über welche man mit den Enzymen nicht immer auf Grund ihrer Spezifität zu entscheiden vermag[2].

Entscheidend geht nun die Verschiedenheit der Mechanismen, deren sich zuckerspaltende Enzyme verschiedener Herkunft beim Abbau ein und desselben Disaccharids bedienen, aus den folgenden Versuchen und Überlegungen hervor.

E. F. ARMSTRONG[3] und C. S. HUDSON[4] haben gezeigt, daß die Glucose im Rohrzucker α-Glucose ist. Das Invertin der Hefe besitzt aber zu dieser Form des Traubenzuckers nicht die geringste Affinität[5]. Man muß daraus per exclusionem schließen, daß die starke Verlangsamung der [59] Inversionsgeschwindigkeiten, die man bei Zusatz von gewöhnlicher Lävulose beobachtet, auch bei Zusatz der im Rohrzucker vorliegenden Form dieser Ketohexose, die in freiem Zustand noch unbekannt ist, zu finden sein wird. Daß für die Vereinigung des Rohrzuckers mit dem Invertin der Hefe nur der Fructoserest in Betracht kommt, wird ferner durch die Tatsache wahrscheinlich gemacht, daß dieses Enzym auch die Raffinose spaltet[1]). In dieser ist nämlich der Galaktoserest an die Glucosehälfte des Rohrzuckers herangetreten[2]). Nur im Fructoserest stimmen das Di- und Trisaccharid völlig überein.

Durch sein Verhalten zu den Spaltprodukten stellt das Rohrzucker hydrolysierende Enzym von Aspergillus oryzae ein vollkommenes Gegenstück zur „Fructosaccharase" der gewöhnlichen Kulturhefen dar. Wie aus der folgenden Zusammenstellung hervorgeht, sind Fructose und β-Glucose ohne Belang für die durch Takasaccharase ausgelösten Inversionsgeschwindigkeiten des Rohrzuckers. Nur diejenige Form des Traubenzuckers, die am Aufbau des Rohrzuckers beteiligt ist, die α-Glucose, zeigt eine stark hemmende Wirkung. Daraus ist zu schließen, daß in diesem Falle das Reaktionszwischenprodukt durch Vereinigung des Enzyms mit dem Glucoserest der Saccharose gebildet wird, daß die „Takadiastase" eine „Glucosaccharase" enthält.

	Hefesaccharase	Takasaccharase
α-Glucose	hemmt nicht	hemmt stark
β-Glucose	hemmt	hemmt nicht
Fructose	hemmt	hemmt nicht.

Die zu den Versuchen 1 bis 5 der Tab. 1 angewandte Hefesaccharase ist die nach dem Verfahren von R. WILLSTÄTTER und W. WASSERMANN[3]) dargestellte Lösung *b* der II. und III. Abhandlung[4]), die auch zu den meisten Versuchen der folgenden Abhandlungen gedient hat. Sie

Galaktosehälfte des Milchzuckers in Beziehung treten kann, ist wahrscheinlich. Ist doch das Emulsin genau so wie die Enzyme der Kefirkörner auch zur Hydrolyse der β-Alkyl-d-galaktoside befähigt. E. FISCHER, Chem. Ber. Bd. 28, S. 1429 [1895]; E. FISCHER und E. F. ARMSTRONG, ebenda, Bd. 35, S. 3153 [1902].

[2] R. KUHN, Chem. Ber. Bd. 56, S. 857 [1923], und zwar S. 859.

[3] Soc. Bd. 83, S. 1305 [1903]. [4] Journ. Am. Chem. Soc. Bd. 31, S. 655 [1909].

[5] III. Mitteilung „Über Spezifität der Enzyme", Diese Zs. Bd. 127, S. 234 [1923]. Über die Affinität zu α-Glucosiden vgl. eine folgende Abhandlung (*Abh. 85*).

[1]) Diese Zs. Bd. 125, S. 28 [1922/23] (*Abh. 81*).

[2]) C. NEUBERG, Biochem. Zs. Bd. 3, S. 519 [1907].

[3]) Diese Zs. Bd. 123, S. 181 [1922].

[4]) Diese Zs. Bd. 125, S. 28 [1922/23], und zwar S. 38; ebenda Bd. 127, S. 234 [1923], und zwar S. 237.

ist ausgezeichnet durch eine fast 6 Monate hindurch beobachtete Konstanz [60] von $K_S = 0{,}029$ und von S.W.[1] = 1,18 (± 0° = 0,85 Minuten). Die erste in Tab. 1 mitgeteilte Bestimmung ist nämlich nach Beendigung aller anderen Versuche ausgeführt. Der Mittelwert der Reaktionskonstanten beträgt 158,5 und stimmt genau mit dem zu Beginn der Versuche gefundenen und bereits mitgeteilten Werte 158,5[2] überein.

Das Taka-Enzym war ein von Parke, Davis & Co. in Michigan, Detroit, nach Takamine dargestelltes Präparat, für dessen freundliche Überlassung ich Herrn Geheimrat C. J. LINTNER und Herrn Prof. H. LÜERS zu großem Danke verpflichtet bin.

Zu den Versuchen 6 bis 9 der Tabelle dienten je 27,4 mg (in 5 ccm Wasser gelöst), die dem vorgewärmten Gemisch von 10 ccm 20proz. Rohrzuckerlösung und 5 ccm n/10-Acetatpuffer ($p_H = 5{,}5$) zugesetzt wurden. Bei den Versuchen 7 bis 11 wurden überdies 1½ bis 3 Minuten vor Zusatz des Enzyms die in der 2. Spalte der Tabelle angegebenen Mengen der fein pulverisierten Hexosen durch rasches Umschwenken in der 30° warmen Zuckermischung in Lösung gebracht. Auf die genaue Einwage von Glucose und Fructose wurde verzichtet, da in Anbetracht der durch sie bedingten Volumänderung der Rohrzuckerlösungen, die sich in weiten verschlossenen Reagenzgläsern befanden, die richtigen Werte für die Anfangsdrehung nur extrapoliert, nicht aber be-

[61] Tabelle 1.

Einfluß der Spaltprodukte auf die Rohrzuckerhydrolyse.

Versuche Nr. 1 bis 5: Inversion bei 30,02 ± 0,05°; Polarisation bei 19°.

Nr.	Enzym und Zucker	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$	Mittel
	Hefesaccharase:						
1	0,1 n-Saccharose	0,0	[3,625]	—	—	—	
		2,5	3,255	0,37	7,8	—	
		8,2	2,45	1,175	24,7	151	158,5
		14,0	1,755	1,87	39,2	155	
		21,5	0,92	2,705	56,8	170	
2	0,1 n-Saccharose	0,0	[5,16]	—	—	—	
	+ 0,11 n-α-Glucose	2,0	4,803	0,357	7,5	—	
		10,0	3,65	1,51	31,6	165	159
		17,3	2,93	2,23	46,7	158	
		25,4	2,33	2,83	59,3	154	
3	0,1 n-Saccharose	0,0	[5,14]	—	—	—	
	+ 0,11 n-β-Glucose	2,0	4,88	0,26	5,5	—	
		9,3	4,02	1,12	23,6	127	134,5
		18,5	3,08	2,06	43,4	134	
		29,7	2,20	2,94	62,0	142	
4	0,1 n-Saccharose	0,0	[+ 0,663]	—	—	—	
	+ 0,11 n-α, β-Fructose¹)	2,0	+ 0,403	0,26	5,5	—	
		10,2	— 0,555	1,218	25,6	126	131
		16,3	— 1,17	1,833	38,6	130	
		25,7	— 1,985	2,648	55,8	138	
5	0,1 n-Saccharose	0,0	[+ 0,663]	—	—	—	
	+ 0,11 n-β-Fructose²)	2,1	+ 0,363	0,30	6,3	—	
		8,8	— 0,47	1,133	23,9	135	134
		15,3	— 1,11	1,733	36,5	130	
		24,8	— 1,91	2,573	54,2	137	

[1] Chem. Ber. Bd. 56, S. 509 [1922/23].
[2] Diese Zs. Bd. 127, S. 234 [1923], und zwar S. 238.
¹) Gleichgewichtsform der γ-oxydischen Fructose.
²) Frisch gelöste Lävulose.

[62]

Fortsetzung von Tabelle 1.
Versuche Nr. 6 bis 11: Inversion bei 29,97 ± 0,03°; Polarisation bei 20,5°.

Nr.	Enzym und Zucker	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$
	Takasaccharase:					
6	0,292 n-Saccharose	0,0	[7,987]		—	[6,15]
		2,0	7,96	0,027	0,26	—
		17,6	7,74	0,247	2,35	5,89
		35,0	7,53	0,457	4,35	5,63
7	0,292 n-Saccharose	0,0	[10,762]	—	—	[2,38]
	+ 0,277 n-α-Glucose	2,0	10,751	0,011	0,11	—
		20,0	10,632	0,13	1,24	2,71
		35,0	10,515	0,247	2,35	2,96
8	0,292 n-Saccharose	0,0	[10,873]	—	—	[6,23]
	+ 0,28 n-β-Glucose	2,3	10,840	0,033	0,31	—
		19,0	10,640	0,233	2,22	5,13
		35,2	10,523	0,35	3,33	4,18
9	0,292 n-Saccharose	0,0	[2,078]	—	—	[6,16]
	+ 0,28 n-α, β-Fructose	1,2	2,060	0,018	0,17	—
		18,0	1,828	0,25	2,38	5,84
		35,3	1,615	0,463	4,40	5,53
10	0,233 n-Saccharose	0,0	[7,265]	—	—	[1,86]
	+ 0,244 n-α-Glucose	1,2	7,261	0,004		—
		11,2	7,225	0,040	0,48	1,86
		21,3	7,19	0,075	0,89	1,82
		30,0	7,155	0,110	1,31	1,91
11	0,233 n-Saccharose	0,0	[7,39]	—	—	[4,30]
	+ 0,23 n-β-Glucose	1,3	7,383	0,007	—	—
		11,0	7,30	0,090	1,07	4,25
		21,1	7,22	0,17	2,02	4,20
		31,7	7,145	0,245	2,92	4,05

rechnet werden konnten. Zur Sistierung der Enzymwirkung und zur Aufhebung der Mutarotation der Zucker wurden je 5 ccm Bestimmungslösung in 3 ccm 2 n-Sodalösung eingetragen. Die angegebenen Drehungswinkel sind das Mittel von je 10 Ablesungen im 2-dm-Rohr. Bei vollständiger Spaltung des Rohrzuckers würde die Drehungsabnahme in den Versuchen 6 bis 9 10,50°, in den Versuchen 10 und 11, zu denen je 22 mg Enzym in 10 ccm Acetatgemisch von $p_H = 5,0$ angewandt wurden, dagegen 8,40° betragen. Versuch 6 zeigt, daß im Gegensatz zum Invertin der Hefe die Inversion durch Takasaccharase etwas langsamer verläuft als monomolekular. Das weit stärkere Fallen der Konstante in dem unter Zusatz von β-Glucose ausgeführten Experiment 8 ist wohl auf die durch Mutarotation entstandene α-Modifikation zurückzuführen, die, wie aus den Versuchen 7 und 10 hervorgeht, stark hemmend wirkt. Die Versuche mit α-Glucose zeigen zugleich, daß der Übergang dieses Zuckers in die indifferente β-Form ein leichtes Ansteigen der Reaktionskonstanten bedingt. Zum besseren Vergleich der Zahlen sind aus diesem Grunde die Werte von $k \cdot 10^4$ für Versuchsbeginn extrapoliert worden. Die mit und ohne Zusatz von Fructose beobachteten Geschwindigkeiten stimmen [63] vollkommen überein. Beim Vergleich von α- und β-Glucose findet man als Verhältnis der Refraktionskonstanten 1 : 2,62 und 1 : 2,31.

Die gewählte Acidität ist nicht als optimal ermittelt worden. Auch konnte mit der geringen Menge des Enzymmaterials nicht entschieden werden, ob das deutliche Reduktionsvermögen, das Raffinose (0,20 g Pentahydrat in 4 ccm Wasser) nach 60 Minuten langer Einwirkung von 3 mg Takapräparat bei 30° erlangt hatte, durch primäre Sprengung des Rohrzucker- oder Meliboserestes zu erklären ist.

Der Vergleich der Affinitäten, den die zuckerspaltenden Enzyme einerseits in wäßriger Lösung, anderseits in der Hefezelle selbst zu stereoisomeren Zuckern aufweisen, wird vielleicht einen Einblick in die Permeabilitätseigenschaften der Zell-

membran, die für das Verständnis der auswählenden Gärung von Zuckergemischen nicht ohne Bedeutung sein dürften, gewähren. Wegen der beträchtlichen Schwierigkeiten, die mit der experimentellen Prüfung dieser Frage verknüpft sind, sei nur ein unter Toluolzusatz ausgeführter Vergleich der Rohrzuckerspaltung mit und ohne Zusatz von α-Glucose mitgeteilt, aus dem hervorgeht, daß, wie in Saccharaselösungen die invertierende Kraft des Enzyms auch in der Hefezelle durch α-Glucose nicht herabgesetzt wird.

Hefe der SINNER A.-G. (28. II. 1923). a) 3,000 g Frischhefe + 2 ccm 20proz. NaH_2PO_4 + 25 Tropfen Toluol + 4,75 g Rohrzucker auf 100 ccm; b) derselbe Ansatz + 2,000 g *a*-Glucose. Es wurden Proben von je 20 ccm der gut umgeschüttelten Suspensionen mit 5 ccm 2n-Na_2CO_3-Lösung versetzt und sofort in der Zentrifuge bei 5000 Umdrehungen in der Minute von der Hefe getrennt, um durch Filtration unter Zusatz von wenig spanischer Klärerde für die Polarisation vorbereitet zu werden. Kohlensäureentwicklung war in den bei 18,4 bis 18,6° stehenden Bestimmungslösungen nicht zu beobachten. Immerhin könnte eine stärkere Gärung der zuckerreicheren Lösung b) etwas zu starke Saccharasewirkung vortäuschen.

a) Ohne Zusatz.

Zeit (Min.)	Drehung (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^3$
0,0	[+ 5,00]	·	—
3,0	+ 4,15	12,9	—
16,0	+ 1,25	57,0	22,9
32,0	— 0,70	86,8	27,5

b) Zusatz von α-Glucose.

Zeit (Min.)	Drehung (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^3$
0,0	[7,10]	—	—
3,5	5,97	17,2	—
17,0	3,20	59,4	23,1
31,5	1,45	86,0	27,1

Zeitschrift für physiologische Chemie 135, S. 1 [1924].

85. ÜBER DEN EINFLUSS STEREOISOMERER ZUCKER SOWIE NICHT SPALTBARER KOHLEHYDRATE UND GLUCOSIDE AUF DIE WIRKSAMKEIT DES HEFEINVERTINS.

Von RICHARD KUHN.

Sechste Mitteilung über Spezifität der Enzyme.

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. Dezember 1923.)

In der dritten[1] und fünften[2] Mitteilung der vorliegenden Untersuchungsreihe wurde erkannt, daß das Verhalten gewisser zuckerspaltender Enzyme zur α- und β-Form der Glucose qualitativ verschieden ist. Für die Saccharase der Löwenbräuhefe geht nun aus den folgenden Beobachtungen hervor, daß das Hemmungsvermögen von Monosacchariden nicht allgemein entweder nur durch die hoch- oder niedrigdrehende Modifikation derselben bewirkt wird. Während die Übereinstimmung zwischen frisch gelöster und Gleichgewichtsfructose durch die Schnelligkeit der Isomerisierung erklärt werden kann[3], zeigen nach Tab. 1 auch verschiedene Formen der d-Mannose und l-Arabinose, die nach C. S. HUDSON und E. YANOVSKY[4] [2] nur drei- bzw. fünfmal schneller mutarotieren als Glucose, fast gleiches Verhalten. Die hemmende Wirkung der frisch gelösten Zucker ist zwar durchwegs geringer als die der Gleichgewichtslösungen, doch überschreiten diese Differenzen die möglichen Versuchsfehler nicht stark. Einen bedeutenden Unterschied findet man nur bei der Galaktose. Im Gegensatz zum Traubenzucker wird aber in diesem Falle auch durch die α-Modifikation die Spaltungsgeschwindigkeit des Rohrzuckers stark verzögert. Diese Verzögerung ist etwa doppelt so stark wie die von den anderen Hexosen bewirkte. Sie dürfte aber in äquimolarer Lösung die Wirkung der Pentose nur wenig übertreffen. Eine allgemeine Beziehung zwischen der Konfiguration der Zucker und ihrer Affinität zur Saccharase ist nicht zu erkennen.

[1] Diese Zs. Bd. 127, S. 234 [1923]. [2] Ebenda, Bd. 129, S. 57 [1923].
[3] In dem bereits mitgeteilten Beispiel (Versuch Nr. 5 der Tab. 1 der fünften Mitt.) verlief die Mutarotation der Ketose etwa zehnmal schneller als die Inversion des Rohrzuckers.
[4] Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 39, S. 1013 [1917].

Tabelle 1. Die Wirkung stereoisomerer Monosaccharide.

Nr.	Zucker in 100 ccm: 3,422 g Saccharose +	α-Form [1] (%)	Reaktionskonstante der Mutarotation (20°)	Reaktionskonstante der Inversion (30°)	Hemmung (%)
1	Ohne Zusatz	—	—	0,0158	—
2	2,00 g α-d-Glucose	100	0,0065	0,0159	0
3	2,00 g β-d-Glucose	0	0,0065	0,01345	15
4	2,00 g α-β-d-Fructose	37	—	0,0131	17,5
5	2,00 g β-d-Fructose	0	0,082	0,0134	15
6	2,00 g α-β-d-Mannose	62	—	0,01355	14
7	2,00 g β-d-Mannose	0	0,019	0,01405	11
8	2,00 g α-d-Galaktose	100	0,0102	0,0103	35
9	2,00 g α-β-d-Galaktose	31	—	0,00835	47,5
10	0,75 g β-l-Arabinose	0	0,031	0,01375	13,5
11	0,75 g α-β-l-Arabinose	42	—	0,0132	16,5

Unter den gewählten Konzentrationsbedingungen hat das Invertin auf die Geschwindigkeit der Mutarotation von Glucose und Galaktose keinen merklichen Einfluß[2].

[3]

a) 1,000 g β-Glucose + 2 ccm m/3-Phosphat zu 50 ccm; p_H = 4,60; 2 dm-Rohr; 19,2°.			b) 1 g β-Glucose + 2 ccm Saccharase b + 2 ccm m/3-Phosphat zu 50 ccm; p_H = 4,58.		
Zeit (Min.)	Drehung (°)	$k \cdot 10^4$	Zeit (Min.)	Drehung (°)	$k \cdot 10^4$
0	[0,71]		0	[0,71]	—
8	0,85	72,5	7,5	0,85	70,5
12	0,92	68,5	15	0,97	69
16,7	1,00	70	20	1,05	70,5
24	1,10	69,5	25	1,12	70,5
41	1,30	69,5	36	1,30	71
57	1,455	71	51	1,40	70
∞	1,94		∞	1,94	—
	Mittel:	70		Mittel:	70,5

Zu den Versuchen der Tab. 2, 3 und 4 (Nr. 1 bis 3) diente die von R. WILLSTÄTTER und W. WASSERMANN[1]) dargestellte Invertinlösung b der zweiten Mitteilung[2]) (Δ 0° = 0,85 Minuten).

Am Beispiel der „Maltase aus Bierhefe" haben L. MICHAELIS und P. RONA[3]) zum ersten Male auf die verschiedenartige Natur der Hemmungen der Fermentwirkungen aufmerksam gemacht. Sie fanden, daß es gewisse Stoffe gibt, die gleich dem Substrat zum Enzym Affinität besitzen, und andere, durch deren Gegenwart die Zerfallsgeschwindigkeit der Fermentsubstratverbindung herabgesetzt wird. Von diesem Gesichtspunkte aus sind L. MICHAELIS und H. PECHSTEIN[4]) der „prinzipiellen, höchst wichtigen Frage" näher getreten, ob das Invertin zu glucosidisch gebauten Stoffen, die es nicht zu spalten vermag, auch keine Affinität besitzt oder ob Bindungs- und

[1] A. a. O.

[2] Siehe auch J. M. NELSON und F. M. BEEGLE, Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 41, S. 559, und zwar S. 572 [1919].

[1]) Diese Zs. Bd. 123, S. 181 [1922].

[2]) Diese Zs. Bd. 125, S. 28 [1922/23], und zwar S. 38.

[3]) Biochem. Zs. Bd. 60, S. 62 [1914]. [4]) Biochem. Zs. Bd. 60, S. 79 [1914].

Spaltungsvermögen des Enzyms unterschieden werden können. Daß letzteres nicht zutrifft, haben MICHAELIS und PECHSTEIN an vier Beispielen dargetan. Milchzucker, Malzzucker, β- und α-Methylglucosid binden nämlich das Invertin nicht. Die ersten drei waren für die Inversionsgeschwindigkeiten überhaupt ohne Belang, während α-Methylglucosid den Zerfall der Enzym-Zucker-Bindung hemmte, wie es z. B. auch für das Glycerin festgestellt wurde.

[4] Tabelle 2. Inversion bei 30,00 ± 0,05°. Polarisation bei 20°.

Nr.	Zucker	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$	Mittel
1	0,1 n-Saccharose	0,0	[3,62]	—	—		
		1,6	3,37	0,25	—	—	
		13,8	1,813	1,807	38,0	150,5	158
		19,5	1,22	2,40	50,5	157	
		25,5	0,66	2,96	62,4	167	
2	0,1 n-Saccharose + 0,11 n β-Mannose	0,0	[4,10]	—	—	—	
		1,8	3,85	0,25	—	—	
		9,2	2,92	1,18	24,9	136	140,5
		19,5	1,90	2,20	46,3	139	
		31,5	1,00	3,10	65,3	146	
3	0,1 n-Saccharose + 0,11 n α-β-Mannose	0,0	[4,025]	—	—	—	
		2,0	3,75	0,275	—	—	
		10,3	2,75	1,275	26,9	132	135,5
		16,8	2,10	1,925	40,5	134	
		25,3	1,38	2,645	55,8	140	
4	0,1 n-Saccharose + 0,11 n α-Galaktose	0,0	[6,09]	—	—	—	
		1,8	5,87	0,22	—	—	
		11,0	4,95	1,14	24,0	109	103
		19,5	4,35	1,74	36,6	102	
		28,5	3,84	2,25	47,4	98	
5	0,1 n-Saccharose + 0,11 n α-β-Galaktose	0,0	[6,11]	—	—	—	
		2,0	5,93	0,18	—	—	
		8,3	5,42	0,69	14,5	82,5	83,5
		20,6	4,59	1,52	32,0	81,5	
		34,2	3,77	2,34	49,3	86,5	
6	0,1 n-Saccharose + 0,05 n β-l-Arabinose	0,0	[4,75]	—	—	—	
		2,1	4,48	0,27	—	—	
		8,5	3,705	1,045	22,0	128	137,5
		18,0	2,625	2,125	44,8	144	
		22,2	2,32	2,43	51,2	141	
7	0,1 n-Saccharose + 0,05 n α-β-l-Arabinose	0,0	[4,70]	—	—	—	
		2,2	4,415	0,285	—	—	
		9,5	3,55	1,15	24,2	127	132
		13,6	3,115	1,585	33,4	130	
		21,9	2,30	2,40	50,5	139	

Der Befund von MICHAELIS und PECHSTEIN findet durch die in der Tab. 3 folgenden Versuche, die mit bedeutend reinerem Enzymmaterial ausgeführt sind, eine erweiternde [5] Bestätigung. Es zeigte sich, daß nicht nur die stereoisomeren Formen der Lactose und Maltose, sondern auch Cellobiose, Melibiose, Gentiobiose und Trehalose ohne sicher erkennbaren Einfluß auf die Inversionsgeschwindig-

keit des Rohrzuckers sind. Neben diesen nicht spaltbaren Disacchariden verdient besonderes Interesse das Verhalten eines Polysaccharids, das aus Fructosemolekülen aufgebaut ist und trotzdem von der Fructosaccharase der Hefe nicht hydrolysiert wird. Das ist das Inulin[1]. Aus der Tatsache, daß das Inulin die Wirksamkeit des auf die Fructoside vom Rohrzuckertyp eingestellten Enzyms in keiner Weise verändert, ist zu schließen, daß seine „Invertinfestigkeit" nicht auf einen unmerklich langsamen Zerfall der Enzym-Inulin-Verbindung zurückzuführen ist, daß vielmehr eine solche in nachweisbarer Menge überhaupt nicht gebildet wird.

0,1 n-Rohrzucker + 1 % Inulin „Kahlbaum"; $p_H = 4{,}5$. Aus den nach 14,6 und 25,9 Minuten beobachteten Drehungsabnahmen von 1,90 und 2,95°, die einem Spaltungsgrad von 40,0 bzw. 62,2 % entsprechen, ergibt sich $k \cdot 10^4$ zu 152 und 163. Der Mittelwert 157,5 stimmt mit der ohne Zusatz gemessenen Reaktionskonstante 158 genau überein.

Auf der nämlichen Ursache dürfte die Invertinfestigkeit der Stärke beruhen.

50 ccm 0,278 n-Rohrzucker + 5 ccm 20proz. NaH_2PO_4 + 5 ccm Saccharase ($\pm 0° = 0{,}53$ Min.) ad 100 ccm.

a) Ohne Zusatz			b) 35 ccm 2proz. lösliche Stärke in 100 ccm		
Zeit (Min.)	5 ccm verbrauchen n/10-Jod[2]	Reduktionszunahme pro Minute	Zeit (Min.)	5 ccm verbrauchen n/10-Jod	Reduktionszunahme pro Minute
1,6	0,34		1,4	0,86	
5,2	0,77	0,119	5,2	1,36	0,131
10,0	1,34	0,119	10,0	1,88	0,108
		Mittel: 0,119			Mittel: 0,119

[6] Tabelle 3.
Die Saccharasewirkung wird durch nicht spaltbare Disaccharide nicht gehemmt. Inversion bei 29,98 ± 0,05°. Polarisation bei 19,5°.

Nr.	0,1 n-Saccharose +	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (%)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$	Mittel
1	0,055 n. α-Lactose (2,000 g Hydrat „Merck" in 100 ccm; frisch gelöst).	0,0	[5,21]	—	—	—	
		2,0	4,92	0,29	—	—	
		8,8	4,02	1,19	25,1	143	152,5
		14,7	3,30	1,91	40,3	153	
		25,2	2,32	2,89	60,8	161	
2	0,055 n. α-β-Lactose (4 Stunden gestandene, in der Hitze bereitete Lösung).	0,0	[5,21]	—	—	—	
		2,7	4,805	0,405	—	—	
		11,5	3,65	1,56	32,9	151	151
		15,9	3,25	1,96	41,3	146	
		21,0	2,70	2,51	52,8	155	
3	0,055 n. β-Maltose (2 g Hydrat „Merck"; 2 Minuten nach dem Lösen).	0,0	[7,77]	—	—	—	
		2,0	7,51	0,26	—	—	
		8,8	6,643	1,127	24,3	139	157
		17,1	5,625	2,145	46,2	158	
		27,3	4,683	3,087	66,5	174	

[1] J. C. IRVINE und E. ST. STEELE, Chem. Soc. Bd. 117, S. 1474 [1920] fassen das Inulin als polymerisierte Anhydro-γ-Fructose auf und vermuten, daß die eine Sauerstoffbrücke mit der im Rohrzucker vorliegenden übereinstimme.

[2] Nach R. WILLSTÄTTER und G. SCHUDEL, Chem. Ber. Bd. 51, S. 780 [1918].

Tabelle 3. (Fortsetzung.)

Nr.	0,1 n-Saccharose +	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$	Mittel
4	0,055 n. α-β-Maltose (in der Hitze gelöst; 2 Stunden gestanden).	0,0	7,775	—	—	—	
		2,7	7,41	0,365	—	—	
		10,6	6,415	1,360	28,6	139	151
		17,6	5,613	2,162	45,5	150	
		26,7	4,765	3,01	63,4	164	
5	0,05 n. Trehalose (1,89 g $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2\,H_2O$).	0,0	[8,98]	—	—	—	
		2,4	8,63	0,35	—	—	
		8,2	7,815	1,165	24,5	149	157,5
		13,4	7,15	1,83	38,5	158	
		21,5	6,33	2,65	55,7	165	
6	0,05 n. α-β-Gentiobiose (1,71 g Präparat nach G. Zemplén[1]; 2 mal mit Alkohol-Äther umgeschieden).	0,0	[3,835]	—	—	—	
		2,0	3,545	0,29	—	—	
		9,0	2,615	1,22	25,6	143	151,5
		15,0	1,895	1,94	40,7	151	
		22,0	1,19	2,645	55,5	160	
7	0,032 n. α-β-Cellobiose (1,09 g über das Octacetat gereinigtes Präparat).	0,0	[4,05]	—	—	—	
		2,8	3,66	0,39	—	—	
		11,6	2,51	1,54	32,4	147	158,5
		15,9	1,94	2,11	44,5	161	
[7]		25,7	1,21	2,84	60,0	168	
8	0,05 n. α-β-Melibiose [1,71 g; nach C. S. Hudson[1]) dargestellt; nicht krystallisiert].	0,0	[7,48]	—	—	—	
		2,7	7,08	0,40	—	—	
		11,1	5,97	1,51	31,8	149,5	151
		15,7	5,52	1,96	41,2	147	
		21,0	4,97	2,51	52,9	156	

Von den in glucosidhaltigen Lösungen ausgeführten Inversionsversuchen teilt Tab. 4 die bei Zusatz von Salicin, Helicin und β-Methylglucosid beobachteten Reaktionsverzögerungen mit[2]). Das Beispiel des Amygdalins, das ohne Wirkung ist, zeigt, daß sich auch innerhalb der engeren Gruppe der β-Glucoside bemerkenswerte Unterschiede im Verhalten zum Invertin finden. In hohem Maße auffallend ist der folgende Vergleich der Wirkungen, den α- und β-Glucose und die zugehörigen halbacetalartigen Methylderivate ausüben. Die Zahlen beziehen sich auf 0,1 n-Rohrzucker- und 0,05 n-Traubenzucker- bzw. Glucosidlösungen:

Zusatz	Hemmung in %	Zusatz	Hemmung in %
α-Glucose	0	α-Methylglucosid . . .	65
β-Glucose	7,5	β-Methylglucosid . . .	15

Die Glucoside setzen die in Rohrzuckerlösungen von wechselnder Konzentration bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten um gleiche prozentische Beträge herab.

[1] Chem. Ber. Bd. 48, S. 233 [1915].

[1]) C. S. Hudson und T. S. Harding, Jl. Am. Chem. Soc. Bd. 37, S. 2734 [1915].

[2]) Vgl. hierzu H. P. Barendrecht, Zs. f. physik. Chem. Bd. 49, S. 456 [1904], und zwar S. 464f.

Der auf diese Weise für das α-Methylglucosid schon von MICHAELIS und PECHSTEIN erbrachte Nachweis, daß das Invertin zu diesem Glucosid keine Affinität hat, möge durch einige mit gereinigtem Invertin gewonnene Zahlen bestätigt werden.

[8]

Tabelle 4.
Das differierende Verhalten einiger β-Glucoside.
(Für die Versuche Nr. 1 bis 3 ist $k \cdot 10^4$ ohne Zusatz = 158.)

Nr.	0,1 n-Saccharose +	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$	Mittel
1	0,05 n β-Methylglucosid („Kahlbaum")	0,0	[3,045]	—	—	—	
		2,4	2,71	0,335	—	—	
		8,5	1,95	1,095	23,1	135	**135**
		13,7	1,45	1,595	33,6	131	
		20,6	0,75	2,295	48,3	139	
2	0,05 n-Salicin („Merck")	0,0	[+ 1,95]	—	—	—	
		1,9	+ 1,725	0,225	—	—	
		8,3	+ 1,00	0,95	20,0	117	**124**
		13,4	+ 0,44	1,51	31,7	124	
		22,3	— 0,375	2,325	48,8	131	
3	0,05 n-Amygdalin („Merck")	0,0	[+ 1,69]	—	—	—	
		2,0	1,40	0,29		—	
		7,8	0,60	1,09	23,0	146	**157**
		13,8	— 0,15	1,84	38,8	156	
		21,1	— 0,97	2,66	56,0	169	
4	Ohne Zusatz[1]	0,0	[2,80]	—		—	
		1,6	2,46	0,34	—		
		6,1	1,78	1,02	27,3	228	**237**
		13,0	0,935	1,865	49,9	231	
		20,7	0,18	2,62	70,0	252	
5	0,088 n-Helicin	0,0	[0,81]		—	—	
		1,3	0,73	0,08	—	—	
		7,3	0,39	0,42	11,2	71	**75,5**
		12,8	+ 0,08	0,73	19,5	73,5	
		21,6	— 0,44	1,25	33,4	82	
6	0,025 n-Octamethyl-lactose	0,0	[3,07]	—	—	—	
		1,6	2,82	0,25	—		
		7,3	1,96	1,11	29,7	210	**240**
		12,1	1,23	1,84	49,2	243	
		17,4	0,61	2,46	65,8	268	
7	0,04n-Tetramethyl-β-methylglucosid	0,0	[2,75]	—		—	
		2,1	2,425	0,325		—	
[9]		8,0	1,57	1,18	31,6	208	**225**
		13,2	0,88	1,87	50,0	228	
		20,5	0,22	2,53	67,6	239	
8	0,04 n. α-2, 3, 5, 6-Tetramethylglucose	0,0	[3,99]	—	—	—	
		1,9	3,73	0,26	—	—	
		6,8	3,07	0,92	24,6	181	**201**
		12,4	2,33	1,66	44,4	206	
		19,0	1,71	2,28	61,0	215	
9	0,04 n α-β-2, 3, 5, 6-Tetramethylglucose	0,0	[3,92]	—	—	—	
		1,6	3,70	0,22	—	—	
		5,8	3,14	0,78	20,8	176	**194**
		12,5	2,30	1,62	43,3	197	
		19,5	1,64	2,28	61,0	210	

[1] Saccharaselösung der fünften Mitteilung über Invertin von R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER, Diese Zs. (im Druck); ± 0° = 0,175 Minuten.

Reaktionskonstanten mit je 0,4 ccm Saccharase b in 100 ccm bei 30°.

Reaktionsgemisch	0,1 n-Rohrzucker	0,05 n-
a) Ohne Zusatz	0,00220	0,00358
b) 0,05 n. α-Methylglucosid	0,00080	0,00117

Die Inversionsgeschwindigkeiten sind also um 63,5 und 67,5% verlangsamt worden. Für die Dissoziationskonstante einer Saccharase-α-Methylglucosidverbindung würde man dagegen die stark differierenden Werte 0,0021 und 0,0038 finden.

Die zu den Versuchen Nr. 6 bis 9 der voranstehenden Tab. 4 benützten methylierten Zucker hatte Herr Dr. H. H. SCHLUBACH in freundlichster Weise zur Verfügung gestellt. Ein Einfluß des permethylierten Milch- und Traubenzuckers konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Die in 1-Stellung freie Methylglucose hemmt merklich. Der Unterschied zwischen α- und α-β-Form liegt jedoch an der Grenze der Versuchsfehler.

Ob der Hemmungsmechanismus der β-Glucoside demjenigen des α-Methylglucosids entspricht, wurde am Beispiel des Salicins geprüft. Es war mit Rücksicht auf das verschiedene Verhalten von α- und β-Glucose nicht ausgeschlossen, daß ein durch Invertin nicht spaltbares β-Glucosid vom Invertin gebunden werden könne. Die folgende, nach den Zahlen [11] der Tab. 5 berechnete Zusammenstellung zeigt

[10] Tabelle 5. Hemmung des Invertins durch Salicin.

Nr.	Zucker + Glucosid	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$	Mittel
1	0,1017 n-Rohrzucker	0,0	[3,705]	—	—	—	
		1,6	3,60	0,105		—	
		6,1	3,255	0,45	9,3	69,5	68,2
		11,4	2,92	0,785	16,1	68,7	
		16,3	2,64	1,065	21,9	66,5	
2	0,1017 n-Rohrzucker + 0,1 n-Salicin	0,0	[0,75]	—	—	—	
		1,2	0,70	0,05	—	—	
		7,0	0,43	0,32	6,6	42,8	39,7
		13,0	0,22	0,53	10,9	38,8	
		18,1	0,05	0,70	14,4	37,6	
3	0,0508 n-Rohrzucker	0,0	[1,85]	—	—	—	
		1,6	1,78	0,07	—	—	
		9,8	1,45	0,40	16,5	80,1	79,2
		21,1	1,06	0,79	32,5	81,0	
		30,1	0,85	1,00	41,1	76,5	
4	0,0508 n-Rohrzucker + 0,1 n-Salicin	0,0	[— 1,06]	—	—	—	
		1,5	— 1,10	0,04	—	—	
		10,0	— 1,32	0,26	10,7	49,5	50,2
		19,4	— 1,55	0,49	20,2	50,4	
		30,1	— 1,71	0,65	26,7	50,7	
5	0,0274 n-Rohrzucker	0,0	[1,00]	—	—	—	
		1,7	0,95	0,05	—	—	
		10,0	0,725	0,275	20,9	102	111
		20,0	0,485	0,515	39,1	108	
		30,0	0,25	0,75	57,0	122	

Tabelle 5. (Fortsetzung.)

Nr.	Zucker + Glucosid	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$	Mittel
6	0,0274 n-Rohrzucker + 0,1 n-Salicin	0,0	[— 1,90]	—	—	—	
		1,3	— 1,92	0,02	—	—	
		10,0	— 2,06	0,16	12,2	57,0	57,5
		20,0	— 2,21	0,31	23,6	59,0	
		30,7	2,33	0,43	32,8	56,5	
7	0,0137 n-Rohrzucker[1]	0,0	[5,04]	—	—	—	
		1,3	0,515	0,025	—	—	
		5,8	0,435	0,105	14,8	120	124,7
		12,3	0,33	0,21	29,2	122	
		17,3	0,25	0,29	40,9	132	
8	0,0137 n-Rohrzucker + 0,1 n-Salicin[1]	0,0	[— 2,388]	—	—	—	
		1,3	— 2,405	0,017	—	—	
		6,1	— 2,458	0,07	9,9	73,8	65,9
		12,0	— 2,505	0,117	16,5	65,0	
		18,2	— 2,543	0,155	21,8	58,8	

jedoch, daß die Aktivitäts-p_S-Kurve durch einen konstanten Salicingehalt keine Parallelverschiebung erleidet, daß vielmehr unabhängig von der Rohrzuckerkonzentration die Inversionskonstanten um annähernd gleiche prozentische Beträge erniedrigt werden.

Konzentration der Saccharose	0,102	0,0508	0,0274	0,0137 n
Hemmung durch 0,1 n-Salicin (%)	41,8	36,6	45,2	47,2

Die für die Dissoziationskonstante einer Salicin-Invertin-Verbindung berechneten Werte würden um 100% differieren.

Die vorliegende Untersuchung stützt somit die Anschauung, daß das katalytische Wirkungsvermögen des Invertins durch sein Bindungsvermögen bedingt wird, daß die fermentative Spaltung des Rohrzuckers als Zwischenreaktionskatalyse aufzufassen ist. Nach früheren Ausführungen über die Bedeutung der H·-Ionen für die enzymatische Hydrolyse zusammengesetzter Zucker und Glucoside[2] hat aber die Vereinigung des Invertins mit dem Rohrzucker nicht mehr im Sinne von MICHAELIS und PECHSTEIN gleichzeitig als hinreichende Bedingung für den Eintritt der Hydrolyse zu gelten.

[1] Wegen Wirkungsabnahme des Enzyms in stark verdünnter Lösung sind die Versuche 7 und 8 nur untereinander, nicht aber mit den Versuchen 1 bis 6 vergleichbar.

[2] R. KUHN, Die Naturwissenschaften 1923, Heft 35, S. 732, und zwar S. 740ff. (*Abh.* 7).

Zeitschrift für physiologische Chemie 134, S. 224 [1924].

86. ÜBER DIE RELATIVE SPEZIFITÄT DER HEFEMALTASE.

Von RICHARD WILLSTÄTTER, RICHARD KUHN und HARRY SOBOTKA.

Siebente Mitteilung über Spezifität der Enzyme[1]; fünfte Mitteilung über Maltase[2].

(Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. Dezember 1923.)

Nach EMIL FISCHER[3] soll die Maltase der Hefe auch zur Spaltung anderer α-Glucoside befähigt sein. Die Prüfung dieser Ansicht mit quantitativen Methoden hat zunächst ergeben, daß die enzymatischen Wirkungen verschiedener Hefen und ihrer Auszüge, ausgedrückt durch die Zeitwerte für Maltase und α-Methylglucosidase, kein konstantes Verhältnis aufweisen[4]. Der erste Teil der vorliegenden Untersuchung ergänzt nun die früheren Erfahrungen durch den Vergleich der Hydrolysengeschwindigkeiten des α-Äthyl-, α-Phenylglucosids und des Amygdalins mit jenen der Maltase und des α-Methylglucosids. Für die Ausführung dieser Versuche sind wir Herrn Dr. W. STEIBELT, der auch die Reaktionsbedingungen der angeführten Hydrolysen ermittelt hat, zu Dank verpflichtet. Im zweiten Teil prüfen wir die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Konzentration der Substrate. Nach dem Vorbilde der Untersuchung über „Saccharase- und Raffinasewirkung des Invertins"[5] wird unter Berücksichtigung der von [225] Hefe zu Hefe und von Substrat zu Substrat wechselnden Affinitätsbeträge aus dem Verhältnis der Enzymwerte auf das Verhältnis der Enzymmengen geschlossen. Es ergibt sich dabei, daß bei gleicher Konzentration der Enzym-Maltose-, Enzym-α-Methylglucosid- und Enzym-α-Phenylglucosid-Verbindungen auch das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeiten innerhalb der Fehlergrenzen unserer Methode unabhängig ist von der Herkunft der angewandten Fermentlösung. Es scheinen somit zwischen den Maltasen der untersuchten Hefen keine wesentlichen Unterschiede zu bestehen, wenn auch die Ursache der Affinitätsverschiedenheiten

[1] Siehe die vorhergehende Abhandlung.
[2] Vierte Mitteilung über Maltase, Diese Zs. Bd. 115, S. 211 [1921] (*Abh. 63*).
[3] Diese Zs. Bd. 26, S. 60 [1898/99].
[4] R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT, Diese Zs. Bd. 115, S. 199 [1921].
[5] R. KUHN, Diese Zs. Bd. 125, S. 28 [1922/23] (*Abh. 81*).

noch ungeklärt ist. Unabhängig davon ist aus diesen Versuchen die Schlußfolgerung zu ziehen, daß eine bestimmte Hefemaltase auch zur Hydrolyse des α-Methyl- und α-Phenylglucosids befähigt ist. Der einheitlichen Natur der β-Glucosidase des Emulsins[1] entspricht die Einheitlichkeit des auf die α-Glucoside eingestellten Hefeferments. Die Amygdalase, welche die β-glucosidische Bindung des im Amygdalin enthaltenen Disaccharids[2] löst, läßt dagegen keine Beziehung zur Maltase erkennen. In einer maltaseentbehrenden Hefe fanden wir sie besonders reichlich vor.

Experimenteller Teil.

1. Das Untersuchungsmaterial.

Das α-Äthylglucosid wurde nach der Angabe von E. FISCHER[3] dargestellt. Herrn Dr. H. O. L. FISCHER sind wir für freundliche Überlassung von Impfkrystallen zu Dank verpflichtet. Unser Präparat schmolz bei 113 bis 114° (unkorr.) und zeigte in 3proz. Lösung $[\alpha]_D = 150{,}6°$ bzw. 150,3°.

α-Phenylglucosid, nach der Methode von E. FISCHER und L. V. MECHEL[4] erhalten, verlor im Vakuum über Schwefelsäure 1 Mol Krystallwasser. Schmelzp. = 170 bis 171° (unkorr.).

8,396 mg Substanz gaben nach F. PREGL 17,30 mg CO_2, 4,90 mg H_2O

$C_{12}H_{16}O_6$ (256,1)	Ber.	56,22 % C	6,30 % H
	Gef.	56,21 „	6,53 „

[226] In 1 g Wasser von 30° lösen sich 0,052 g des Glucosids; 1,534 g Lösung enthielten nämlich 0,0757 g Substanz.

Die untersuchten Brauereihefen verdanken wir den Betrieben der Aktienbrauerei zum Löwenbräu, der Brauerei zum Spaten, der Brauerei G. Pschorr und des Hofbräuhauses. Eine im folgenden als „Ottakringer Hefe" bezeichnete österreichische Brauereihefe entstammte der Brauerei I. & J. Kuffner A.-G., Wien XVI, Ottakringerstraße 91. Eine obergärige Weißbierhefe bezogen wir aus dem Weißbräuhaus Schneider & Sohn, München im Tal. Von obergärigen Brennereihefen untersuchten wir die vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin N, vertriebenen Hefen M und XII, ferner eine Spirituspreßhefe aus der Spiritus- und Preßhefefabrik Stadlau, Wien XXI (Wolfrum A.-G.), und eine als „Fineste Presse Gaer" bezeichnete Bäckerhefe der Dansk Gaer Central in Kopenhagen, die wir der Gefälligkeit des Herrn Prof. Dr. A. JÖRGENSEN verdankten.

2. Bestimmungsmethoden.

Zur Bestimmung der Enzymwerte dienten frische Hefen und daraus dargestellte Extrakte. Hefemengen, deren Trockengewichte 2,5 g betrug, wurden nach dem Verfahren von R. WILLSTÄTTER, G. OPPENHEIMER und W. STEIBELT[1]) verflüssigt und

[1] Vierte Mitteilung über Spezifität, Diese Zs. Bd. 129, S. 33 [1923].
[2] Chem. Ber. Bd. 56, S. 857 [1923].
[3] Chem. Ber. Bd. 28, S. 1145 [1895], und zwar S. 1153.
[4] Chem. Ber. Bd. 49, S. 2813 [1916].
[1]) Diese Zs. Bd. 110, S. 232 [1920].

nach dem Neutralisieren auf 50 ccm gebracht. Von den Suspensionen wurden in der Regel angewandt für die Spaltung von:

Maltose und α-Methylglucosid . . . . je 10 ccm
α-Äthylglucosid und Amygdalin . . . je 2 ,,
α-Phenylglucosid . . . . 0,1 ,,

Die Hydrolyse des Malzzuckers und des α-Methylglucosids verfolgten wir unter den in der III. Mitteilung über Maltase[2] beschriebenen Bedingungen. Als Maß für die Wirksamkeit benützen wir, wie es für die Wirkungen des Emulsins geschehen ist[3], Enzymwerte, nämlich das mit 1000 multiplizierte Reziproke der bisher geltenden Zeitwerte, die wir in 0,139n-Lösung der Substrate bestimmen.

[227] A. Quantitative Bestimmung der Amygdalinspaltung.

Den Amygdalasewert (Agd.W.) berechnen wir in der eben angeführten Weise aus der Zeit in Minuten, die 0,2 g trockene Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung braucht, um bei 30° 0,7097 g Amygdalin ($C_{20}H_{27}O_{11}N \cdot 3H_2O$) zur Hälfte zu hydrolysieren, wenn diese in 10 ccm 0,1n-Citratgemisch vom $p_H = 5,5$ enthalten sind. Der gebildete Zucker wurde nach der Methode von G. BERTRAND bestimmt. Eine gewisse Ungenauigkeit der Resultate wird dadurch bedingt, daß einzelne Hefen auch das gebildete Prunasin merklich unter Blausäureentwicklung angriffen[1]). Das optimale p_H wurde unter Verwendung eines Chloroformextrakts aus frischer Löwenbräuhefe zu 5,5 ermittelt.

Tabelle 1. Amygdalinspaltung bei wechselnder Acidität.

p_H	Puffer	Versuchsdauer (Stdn.)	5 ccm verbr. Permanganat (ccm)	Spaltung (%)	Zeit der halben Hydrolyse (Stdn.)
4,8	Phosphat 10,0; 0,0	16	6,36	26,0	38,8
5,8	Phosphat 9,2; 0,8	16	6,40	26,7	37,3
6,8	Phosphat 5,0; 5,0	16	5,16	20,8	51,0
7,8	Phosphat 0,8; 9,2	16	4,15	16,6	70
5,0	Citrat-NaOH 10,0; 0,0	40	10,53	44,6	46,5
5,5	Citrat-NaOH 7,3; 2,7	40	11,26	47,8	42,5
6,0	Citrat-NaOH 6,0; 4,0	40	10,64	45,2	45,5

Im Bereiche 1:3 ist ferner die Reaktionsgeschwindigkeit den angewendeten Enzymmengen direkt proportional.

[228]

Enzymmenge in 10 ccm	Zeit (Stdn.)	Cu (mg)	Spaltung %
1 ccm	72	47,9	48,4
3 ccm	24	48,4	48,9

Der zeitliche Verlauf der Amygdalinspaltung fügt sich, wie aus den Versuchen der Tab. 2 hervorgeht, der für eine monomolekulare Reaktion berechneten Gleichung.

[2] Diese Zs. Bd. 115, S. 199 [1921].
[3] Diese Zs. Bd. 129, S. 33 [1923], und zwar S. 35f. (*Abh. 83*).
[1]) Vgl. C. NEUBERG und E. FÄRBER, Biochem. Zs. Bd. 78, S. 264 [1917].

Tabelle 2.
Zeitlicher Verlauf der Amygdalinspaltung.
30°; 7,097 proz. Amygdalinlösung; $p_H = 5,5$.

Zeit Min.	x ccm verbr.	Permanganat ccm	Spaltung %	$k \cdot 10^6$
850	5	3,72	14,8	(81,5)
1635	4	4,84	24,3	70,3
2670	4	6,79	34,8	69,5
3850	3	6,76	46,1	69,9
4370	3	7,37	50,6	70,1
5300	2	5,55	56,2	67,7
6745	2	6,50	66,4	69,7
8400	1	3,82	76,2	74,2
1280	5	5,74	23,4	90,5
2450	4	7,50	38,7	94,0
2980	3	6,57	44,9	86,8
3900	3	7,81	53,7	85,8
5350	2	6,44	65,8	87,3
7000	2	7,10	77,5	92,5

B. Reaktionsbedingungen für die Hydrolyse des α-Äthylglucosids.

Bei vergleichenden Analysen des Reaktionsverlaufs nach G. BERTRAND und nach der polarimetrischen Methode ergeben sich bei der Hydrolyse des α-Methyl- und α-Äthylglucosids Differenzen in dem Sinne, daß nach der Kupfermethode weniger Glucose gefunden wird. Die Divergenz kann nicht ausschließlich auf die Eigendrehung der Extrakte bzw. den Übertritt [229] linksdrehender Substanzen aus der Hefe in das Reaktionsgemisch zurückgeführt werden. Die Tatsache, daß bei Anwendung von Hefeauszügen die Differenz mit der Länge der Versuchsdauer zunimmt, deutet vielmehr auf eine chemische Reaktion des Zuckers mit Inhaltsstoffen der Hefe[1].

1. Beispiel. Extrakt aus Löwenbräuhefe mit α-Methylglucosid.

	nach 60 Minuten	nach 155 Minuten	
optisch	29,0	49,1	% Spaltung
reduktometrisch	26,2	44,5	
Differenz	2,8	4,6	

2. Beispiel. Für α-Äthylglucosid ergaben sich:

	nach 60 Minuten	nach 155 Minuten	
optisch	29,8	52,0	% Spaltung
reduktometrisch	28,6	49,6	
Differenz	1,2	2,4	

Zu allen folgenden Versuchen bedienten wir uns der polarimetrischen Bestimmungsmethode und ließen das Enzym, der Definition des Enzymwertes entsprechend, in 2,889 proz. Äthylglucosidlösung von $p_H = 6,8$ ($^m/_{15}$-Phosphat enthaltend) wirken. Nach Verdünnung mit $^1/_5$ Volumen 2n-Sodalösung beträgt die Anfangsdrehung des Reaktionsgemisches im 2 dm-Rohr 7,20°, die Enddrehung 2,20°. Als optimales p_H ergab sich unter Anwendung eines Chloroformauszugs aus frischer Löwenbräuhefe 6,8. Bei 6,4 und 7,2 war die Wirksamkeit um 5% geringer.

[1] Vgl. H. SOBOTKA: Zur Kenntnis der Trockenhefe, Diese Zs. (im Druck) (*Abh. 71*).

Proportionalität von Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit ist im geprüften Bereich von 1:10 genau erfüllt.

Enzymmenge ccm	Zeit Min.	Drehungsabnahme (°)	Spaltung %
1	40	2,43	48,6
0,1	40	2,41	48,2

Die Kinetik der Glucosidhydrolyse folgt bald dem Gesetz für eine monomolare Reaktion, bald verläuft die Zeit-Umsatz-Kurve wesentlich flacher. Als Beispiele seien zwei mit Extrakten [230] aus Löwenbräuhefe (Tab. 3) und ein mit Hefeauszug aus Ottokringer Brauereihefe (Tab. 4) ausgeführter Versuch mitgeteilt.

Tabelle 3.
Zeitlicher Verlauf der α-Äthylglucosidspaltung; Löwenbräuhefeauszug. 30°; 2,889% Substrat, p_H = 6,8.

Zeit Min.	x ccm verbr.	Permanganat ccm	Spaltung %	$k \cdot 10^4$
55	5	6,97	28,6	26,6
95	4	8,77	45,7	27,9
125	3	7,86	54,0	27,0
155	3	9,04	63,0	27,8
185	2	6,34	65,6	25,1
215	2	7,08	72,6	26,2
265	2	8,06	83,4	29,4
60	5	4,58	18,8	15,0
120	4	6,46	33,0	14,5
180	3	6,63	45,2	14,5
240	3	8,03	55,2	14,5
300	2	6,39	65,2	15,3
420	2	7,60	78,6	15,9

Tabelle 4.
Hydrolyse des α-Äthylglucosids durch Enzymlösung aus Ottakringer Hefe. Versuchsbedingungen wie in Tabelle 3.

Zeit Min.	Drehungsabnahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$
30	0,74	14,8	23,2
60	1,24	24,8	20,6
120	1,83	36,6	16,5
180	2,25	45,0	14,5
240	2,55	51,0	12,9
320	2,80	56,0	11,1

C. Zur Hydrolyse des α-Phenylglucosids.

Den Reaktionsverlauf verfolgten wir wie beim Amygdalin mittels der Kupfermethode. Der Definition von Enzymwert [231] entsprechend waren 0,3556 g des Glucosids in 10 ccm Phosphatgemisch von 6,8 enthalten. Bei wechselnder Acidität fanden wir nämlich p_H 6,8 etwas günstiger als 6,4 und 7,2. Proportionalität von Fermentmenge und Hydrolysengeschwindigkeit gilt für den geprüften Bereich 1:6.

Enzymmenge in 10 ccm	Zeit (Min.)	Cu aus 1 ccm (mg)	Spaltung (%)
0,15	195	24,9	49,1
0,90	32,5	24,7	48,8

Der in Tab. 5 wiedergegebene Verlauf der Zuckerbildung fügt sich bis zu etwa 50% Spaltung gut der von R. WILLSTÄTTER und W. STEIBELT für die Hydrolyse des α-Methylglucosids mitgeteilten Kurve.

Tabelle 5. Kinetik der α-Phenylglucosidspaltung.
30°; 3,556% Glucisod; $p_H = 6,8$.

Zeit (Min.)	x ccm verbr.	Permanganat (ccm)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^4$
30	2	1,74	16,8	26,5
70	2	2,97	29,0	21,2
120	2	3,96	38,8	17,8
195	1	2,54	49,9	15,0
275	1	2,86	55,0	12,6
450	1	3,18	62,0	9,0

3. Die Enzymwerte und ihre Quotienten.

In den Tab. 6 und 7 sind jene Enzymwerte, die für eine Reaktion erster Ordnung berechnet sind, mit + versehen. Die übrigen sind graphisch nach der erwähnten Methylglucosidasekurve gefunden worden. Von den untersuchten Hefen weisen in Übereinstimmung mit den früheren Erfahrungen die Münchener Brauereihefen die stärkste Maltasewirkung auf. Spatenbräu- und Löwenbräuhefe sind auch für die Hydrolyse der übrigen Substrate am besten geeignet. Die maltaseärmere [232] dänische

Tabelle 6.
Wirkung frischer Hefen auf Malzzucker, α-Methyl-, α-Äthyl-, α-Phenylglucosid sowie Amygdalin.

Nr.	Hefe	Maltase-Wert	α-Methylgl.-Wert	α-Äthylgl.-Wert	α-Phenylgl.-Wert	Amygd.-Wert
1	Kopenhagener	3,28	3,84 +	4,76	21,7	0[1]
	(20. XII. 21)	3,22	3,77 +	4,61	20,8	0[2]
2	Kopenhagener	.....	3,45	7,14 +	16,2	.....
	(10. III. 22)	.....	3,45	6,67 +	15,7	.....
3	Ottakringer	13,3	5,00	7,68 +	42,6	0,167
	(13. I. 22)	.....	4,55	6,67 +	38,5	0,159
4	Ottakringer	.....	4,88	14,9	138	.....
	(15. III. 22)	.....	.....	14,8	139	.....
5	Spatenbräu	30,3	8,54 +	24,4 +	156	0,200
	(27. I. 22)	30,3	8,40 +	20,4 +	154	.....
6	Löwenbräu	37,0	7,52	22,7 +	154	0,278
	(19. I. 22)	.....	7,46	19,6 +	159	.....
7	Stadlauer	(0,1)	(0,14)	.....	1,25	0,278
8	Rasse XII	(0,5)	(0,19)	.....	1,48	0[3]
9	Rasse M	(0,7)	(0,37)	.....	2,10	0[4]

[1] Bestimmungsdauer 4 Tage.
[2] Bestimmungsdauer 20 Tage.
[3] Bestimmungsdauer 1 Tag.
[4] Bestimmungsdauer 5 Tage.

Bäckerhefe wirkt auch auf Methyl-, Äthyl- und Phenylglucosid schwächer, während sie der Amygdalase entbehrt. Die maltasearmen Brennereihefen M und XII spalten auch das α-Phenylglucosid bedeutend langsamer als die übrigen Hefen. Eine Wirkung auf Amygdalin konnte hier überhaupt nicht festgestellt werden. Auffallend ist der Amygdalasereichtum der Preßhefe von Stadlau, die sich hinsichtlich ihrer sonstigen Glucosidasewerte den Berliner Brennereihefen anreiht.

Die Wirkungswerte der Hefeauszüge (Tab. 7) entsprechen im wesentlichen denen des Ausgangsmaterials. Bemerkenswert ist der verhältnismäßig günstige Amygdalasewert [233] eines Auszugs aus einer Kopenhagener Hefe, die $2^1/_2$ Monate später als die in Tab. 6 (Nr. 1) verzeichnete amygdalasefreie Lieferung bezogen wurde.

Tabelle 7. Wirkungswerte verschiedener Hefeauszüge.

Nr.	Extrakt aus	Maltase-Wert	α-Methylgl.-Wert	α-Äthylgl.-Wert	α-Phenylgl.-Wert	Amygd.-Wert
10	Kopenhagener	0,80	0,14	. . . . .	. . . . .	0,13
	(10. III. 22)	0,78	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . .
11	Weißbräu	25,0	6,37	17,5	. . . . .	0,14
	(15. II. 22)	. . . . .	6,49	17,0	. . . . .	. . . .
12	Hofbräu	71,4	12,0	27,8	222	0,20
	(22. II. 22)	. . . . .	11,8	25,7	232	. . . .
13	Pschorrbräu	32,3	9,34	23,8	198	0,40
	(6. II. 22)	32,3	9,62	22,2	. . . . .	. . . .
14	Ottakringer	14,9	4,54	19,9	118	. . . .
	(15. III. 22)	. . . . .	4,54	19,9	. . . . .	. . . .
14a	Derselbe	. . . . .	2,44	7,94	76,9	. . . .
	2 Tage älter	. . . . .	2,38	7,94	. . . . .	. . . .
15	Spatenbräu	31,3	7.14	23,3	187	. . . .
	(27. I. 23)	. . . . .	7,04	20,8	185	. . . .
16	Löwenbräuhefe					
	(14. II. 22)	27,0	6,67	18,2	. . . . .	. . . .
16a	Derselbe, 4 Tage älter .	. . . . .	1,39	3,51	. . . . .	. . . .
16b	Derselbe, 7 Tage älter .	. . . . .	1,07	2,74	. . . . .	. . . .
17	Löwenbräuhefe					
	(21. III. 22)	. . . . .	5,74	15,2	. . . . .	. . . .
17a	Derselbe	. . . . .	0,00	0,71	. . . . .	. . . .
	6 Tage später		0,01	1,00	. . . . .	. . . .

[234] Tabelle 8. Enzymwertquotienten der Hefen.

Nr.	Hefe	α-Meth. / Malt.	α-Äthyl / Malt.	α-Phen. / Malt.	Amydg. / Malt.	α-Äthyl / α-Meth.	α-Phen. / α-Meth.	Amygd. / α-Meth.
1	Kopenhagener . . .	1,17	1,44	6,53	0,00	1,23	5,59	0,00
2	Kopenhagener . . .	. . . .	. . . .	. . . . .	. . . . . .	2,00	4,62	. . . . .
3	Ottakringer	0,36	0,54	3,05	0,012	1,50	8,63	0,034
4	Ottakringer	. . . .	. . . .	. . . . .	. . . . . .	3,05	28,4	. . . . .
5	Spatenbräu	0,28	0,74	5,12	0,0066	2,65	18,3	0,024
6	Löwenbräu	0,20	0,57	4,22	0,0075	2,82	20,9	0,037
7	Stadlauer.	(1,4)	. . . .	(12,5)	(2,78)	. . . .	(8,9)	(2,0)
8	Rasse XII	(0,38)	. . . .	(3,0)	0,0	. . . .	(7,8)	0,0
9	Rasse M	(0,53)	. . . .	(3,0)	0,0	. . . .	(5,7)	0,0

Die Tab. 8 und 9 unterrichteten über das Verhältnis der in den Tab. 6 und 7 angeführten Enzymwerte. Die Zahlen der 3. bis 6. Spalte sind auf Maltase, die der 7. bis 9: auf α-Methylglucosidase bezogen.

Tabelle 9. Enzymwertquotienten der Extrakte.

Nr.	Extrakt aus	α-Meth. / Malt.	α-Äthyl / Malt.	α-Phen / Malt.	Amygd. / Malt.	α-Äthyl / α-Meth.	α-Phen. / α-Meth.	Amygd. / α-Meth.
10	Kopenhagener . . .	0,18	....	....	**0,16**	......	....	**0,93**
11	Weißbräu	0,26	0,69	....	0,0056	2,68	....	0,022
12	Hofbräu	**0,17**	**0,37**	**3,18**	**0,0028**	**2,25**	**19,1**	**0,017**
13	Pschorrbräu	0,29	0,71	6,12	0,012	2,44	20,9	0,042
14	Ottakringer	**0,30**	**1,34**	**7,92**	......	**4,38**	26,0	.....
14a	Ottakringer	....	....	....	......	3,29	**31,9**	.....
15	Spatenbräu	0,23	0,70	5,94	......	3,11	26,2	.....
16	Löwenbräu	0,25	0,67	....	......	2,73	....	.....
16a	Löwenbräu	....	....	....	......	2,53	....	.....
16b	Löwenbräu	....	....	....	......	2,56	....	.....
17	Löwenbräu	....	....	....	......	2,65	....	.....
17a	Löwenbräu	....	....	....	......	>100	....	.....

Das scheinbare Mengenverhältnis der α-Methylglucosidase zur Maltase schwankt bei den angeführten Hefen zwischen 0,2 für Löwenbräuhefe und 1,4 für die Preßhefe von Stadlau. Geringer sind die Schwankungen, die bei den Auszügen gefunden wurden. Die extremen Quotienten (Hofbräu- und Ottakringer Hefeauszug) verhalten sich wie 4:7. Die auf Maltase bezogenen Äthylwertquotienten (0,5 bis 1,4) differieren bei den [235] Hefen nur halb so stark wie die entsprechenden Methylwertquotienten. Sie erreichen dagegen bei den Enzymlösungen das Verhältnis 0,37 (Hofbräu) zu 1,34 (Auszug aus Ottakringer Hefe). Bei denselben Extrakten ergeben sich auch die größten Unterschiede für das Verhältnis Phenylglucosidase: Maltase und Äthyl-:Methylglucosidase (2,25 bzw. 4,38).

4. Die Affinitäten der Maltasen.

Bei der Bestimmung der Aktivitäts-p_S-Kurven beschränkten wir uns auf den Vergleich des Malzzuckers mit den einfachsten Vertretern der aliphatischen und aromatischen α-Glucoside. Als Ferment dienten durchwegs 10proz. Neutralauszüge aus getrockneten Hefen. Wir entschieden uns für zwei nach Tab. 9 möglichst verschiedene Brauereihefen, nämlich für die Hefe Nr. 12 (Hofbräu) und (in Ermangelung der Ottakringer Bierhefe) für eine am 2. II. 1923 getrocknete Hefe der Löwenbrauerei; als Brennereihefe wurde ein getrockneter Anteil der in den Tab. 6 und 8 mit Nr. 1 bezeichneten Kopenhagener Hefe gewählt. Von den Extrakten ließen wir für die Spaltung von Maltose und Methylglucosid je 10 ccm, für die des Phenylderivates 0,5 ccm in 50 ccm 0,4n-Phosphat ($p_H = 6{,}8$) enthaltenden Glucosidlösungen wechselnder Konzentration bei 30° ± 0,05° wirken. Zur Sistierung der Enzymwirkung wurden in der Regel 10 ccm 1proz. Mercurichloridlösung auf 10 ccm Reaktionsgemisch angewandt; der Spaltungsgrad wurde frühestens nach 3stündigem Stehen polarimetrisch ermittelt. Bei den in der 4. Spalte der Tab. 10 bis 17 angeführten Drehungswerten

ist der Verdünnung durch die Sublimatlösung bereits Rechnung getragen. Die zu jeder Affinitätsmessung gehörigen 5 bis 6 Versuche setzten wir gleichzeitig an. Wegen der geringen Haltbarkeit der Maltaselösungen sind die in Tab. 18 verzeichneten Reaktionskonstanten in 0,14n-Lösung[1] noch besonders ermittelt worden. Die Affinitäten zu den verschiedenen Substraten konnten wir nämlich nicht mit ein und derselben Enzymlösung an einem Tage bestimmen.

[236]

Tabelle 10. Löwenbräuhefe, Maltose.
$K_{Ma} = 0,12$

[Maltose]	− log [*Ma*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-geschw. (10 Min.)	100 φ ber.	100 φ gef.	Δ
0,240	0,62	0	[22,76]	—	200	66,6	68,3	+ 1,7
		0,8	22,64	0,12				
		20,3	19,72	3,04				
		40,2	18,38	4,38				
		70,2	17,26	5,50				
0,142	0,85	0	[13,37]	—	152	53,2	51,8	− 1,4
		1,0	13,26	0,11				
		20,2	11,06	2,31				
		40,2	10,02	3,35				
		70,0	9,10	4,27				
0,0937	1,03	0	[8,84]	—	130	43,8	44,4	+ 0,6
		0,8	8,76	0,08				
		20,0	6,86	1,98				
		40,0	6,10	2,74				
		69,3	5,44	3,40				
0,0466	1,33	0	[4,39]	—	80	28,2	27,4	— 0,6
		0,8	4,34	0,05				
		19,6	3,14	1,25				
		40,0	2,64	1,75				
		70,5	2,40	1,99				
0,0234	1,63	0	[2,18]	—	50	16,4	17,0	+ 0,6
		0,8	2,16	0,02				
		30,0	1,28	0,90				
		71,0	1,08	1,10				
0,0117	1,93	0	[1,09]	—	27	9,2	9,2	± 0
		0,6	1,08	0,01				
		31,3	0,59	0,50				
		70,0	0,48	0,61				

Tabelle 11. Hofbräuhefe, Maltose.
$K_{Ma} = 0,145.$

[Maltose]	− log [*Ma*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-geschw. (10 Min.)	100 φ ber.	100 φ gef.	Δ
0,245	0,61	0	[23,10]	—	(147)	62,8	(71,4)	(+ 8,6)
		0,8	22,94	0,16				
		6,0	21,92	1,18				
		20,6	20,64	2,46				
		40,2	20,00	3,10				

[1] Anstatt der in den früheren Untersuchungen über Maltase gewählten Konzentration 0,139.

[237]

Tabelle 11. (Fortsetzung.)

[Maltose]	log [*Ma*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-geschw. (10 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,146	0,84	0	[13,80]	—				
		0,7	13,72	0,08				
		6,0	13,12	0,68	106	50,2	50,4	+ 0,2
		31,2	11,82	1,98				
		48,0	11,40	2,40				
0,0948	1,02	0	[9,48]	—				
		0,6	9,42	0,06				
		10,9	8,54	0,94	86	40,9	40,9	± 0
		24,8	8,06	1,42				
		49,2	7,54	1,94				
0,0472	1,33	0	[4,45]	—				
		0,7	4,42	0,03				
		10,3	3,94	0,51	51	24,6	24,3	— 0,3
		25,3	3,58	0,87				
		50,2	3,24	1,21				
0,0293	1,53	0	[2,26]	—				
		0,7	2,24	0,02				
		15,2	1,80	0,46	31	14,2	14,7	+ 0,5
		41,1	1,39	0,87				
0,0107	1,97	0	[1,01]	—				
		0,6	1,00	0,01				
		15,0	0,84	0,17	17	6,9	8,1	+ 1,2
		39,0	0,61	0,40				

Tabelle 12. Kopenhagener Hefe, Maltose.

$K_{Ma} = 0,30$.

[Maltose]	log [*Ma*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-geschw. (10 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,313	0,50	0	[29,56]	—				
		1,0	29,40	0,16				
		26,0	25,83	3,73	(420)	51,0	—	—
		85,2	24,30	5,26				
0,193	0,71	0	[18,20]	—				
		0,8	18,16	0,04				
		40,2	16,06	2,14	213	39,1	39,2	+ 0,1
		82,4	15,48	2,72				
		184,8	14,08	4,14				
0,0972	1,01	0	[9,18]	—				
		0,8	9,16	0,02				
		40,8	7,84	1,34	132	24,5	24,3	— 0,2
		79,9	7,44	1,74				
[238]		173,6	6,64	2,54				
0,0473	1,33	0	[4,56]	—				
		1,0	4,54	0,02				
		40,4	3,82	0,74	73	13,6	13,5	— 0,1
		79,0	3,54	1,02				
		175,5	3,00	1,56				
0,0231	1,64	0	[2,07]	—				
		1,2	2,06	0,01				
		40,4	1,68	0,39	38	6,8	7,0	+ 0,2
		81,1	1,46	0,61				
		179,0	1,18	0,89				

Tabelle 13. Löwenbräuhefe, α-Methylglucosid.

$K_{Me} = 0,075$.

[Methyl-glucosid]	log [*Me*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-geschw. (20 Min.)	100 ρ ber.	100 ρ gef.	f
0,2505	0,60	0	[15,35]					
		0,5	15,32	0,03				
		30	13,60	1,75	122	77,0	77,3	+ 0,3
		60	12,60	2,75				
		100	11,82	3,53				
0,1205	0,92	0	[7,40]					
		1,0	7,36	0,04				
		31,5	6,08	1,32	98	61,8	61,9	+ 0,1
		60	5,44	1,96				
		100	4,82	2,58				
0,0608	1,22	0	[3,73]					
		0,5	3,72	0,01				
		30,5	2,86	0,87	68	44,8	44,2	— 0,6
		60	2,42	1,31				
		100	2,16	1,57				
0,0313	1,50	0	[1,92]	—				
		0,5	1,91	0,01	44	28,9	28,7	— 0,2
		35	1,31	0,61				
		80	0,99	0,93				
0,0158	1,80	0	[0,97]	—				
		1	0,96	0,01	26	17,4	17,6	+ 0,2
		35	0,64	0,33				
		83	0,42	0,55				

[239]

Tabelle 14. Hofbräuhefe, α-Methylglucosid.

$K_{Me} = 0,028$.

[Methyl-glucosid]	log [*Me*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-geschw. (20 Min.)	100 ρ ber.	100 ρ gef.	f
0,231	0,64	0	[14,15]	—				
		0,8	14,12	0,03				
		10,2	13,76	0,39	(91)[1]	89,3	(> 100)	
		50	12,80	1,35				
		100	11,92	2,23				
0,119	0,92	0	[7,28]	—				
		0,8	7,26	0,02				
		45	6,54	0,74	53	81,0	81,0	± 0
		90,2	6,04	1,24				
		135	5,78	1,50				
0,0567	1,25	0	[3,47]	—				
		0,6	3,45	0,02				
		50	2,80	0,67	43	67,0	66,4	— 0,6
		90	2,56	0,91				
		134,6	2,28	1,19				
0,0284	1,55	0	[1,74]	—				
		0,8	1,73	0,01	33	50,3	51,0	+ 0,7
		57,4	1,20	0,54				
		119,2	0,92	0,82				
0,0158	1,80	0	[0,97]	—				
		0,7	0,97		23	36,0	35,9	— 0,1
		61,2	0,60	0,37				
		120,3	0,43	0,54				

[1] Der erste Versuch war 4 Stunden vor den andern Versuchen angesetzt worden.

Tabelle 15. Kopenhagener Hefe, α-Methylglucosid.
$K_{Me} = 0{,}037$.

[Methyl-glucosid]	− log [*Me*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-geschw. (20 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,303	0,52	0	[18,58]	—				
		1,0	18,54	0,04				
		20,0	18,14	0,44	(46)[2]	89,4	—	—
		75,0	17,84	0,74				
		171,2	17,22	1,36				
0,199	0,70	0	[12,21]	—				
		0,7	12,20	0,01				
		60,7	11,68	0,53	37	84,3	85,3	+ 1,0
		134,9	11,24	0,97				
[240]		323,0	10,54	1,67				
0,098	1,01	0 } 0,7	6,02	.....				
		60,1	5,60	0,42	31	72,5	71,6	− 0,9
		127,6	5,30	0,72				
		319,4	4,73	1,29				
0,0512	1,29	0 } 0,7	3,14	—				
		70,3	2,76	0,38	25	58,0	57,7	− 0,3
		129,6	2,50	0,64				
		318,3	2,14	1,00				
0,0261	1,58	0 } 0,8	1,60	—				
		75,0	1,26	0,34	18	41,3	41,7	+ 0,4
		133,7	1,14	0,46				
		320,6	0,92	0,68				

Tabelle 16. Löwenbräuhefe, α-Phenylglucosid.
$K_{Ph} = 0{,}050$.

[Phenyl-glucosid]	− log [*Ph*]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungs-abnahme (°)	Relative Anfangs-geschw. (10 Min.)	100 ϱ ber.	100 ϱ gef.	Δ
0,0808	1,09	0	[7,50]	—				
		0,8	7,44	0,06	59	61,8	62,0	+ 0,2
		10,1	6,90	0,60				
0,0389	1,41	0	[3,61]	—				
		0,7	3,56	0,05				
		9,9	3,20	0,41	41	43,8	43,0	− 0,8
		19,9	2,96	0,65				
		30,2	2,80	0,81				
0,0178	1,75	0	[1,65]	—				
		0,8	1,62	0,03				
		10,0	1,40	0,25	25	26,2	26,3	+ 0,1
		20,0	1,20	0,45				
		30,1	1,00	0,65				
0,0089	2,05	0	[0,71]	—				
		0,9	0,70	0,01				
		10,2	0,55	0,16	16	15,1	16,8	+ 1,7
		20,0	0,39	0,32				
		30,2	0,29	0,42				

[2] Mehrere Stunden früher angesetzt.

[241] Tabelle 17. Hofbräuhefe, α-Phenylglucosid.

$K_{Ph} = 0{,}021$.

[Phenylglucosid]	−log [Ph]	Zeit (Min.)	Drehung (°)	Drehungsabnahme (°)	Relative Anfangsgeschw. (10 Min.)	$100\,\varphi$ ber.	gef.	Δ
0,0842	1,07	0	[7,79]	—				
		0,9	7,76	0,03	47	80,0		—
		5,2	7,50	0,29				
0,0443	1,33	0	[4,11]	—				
		1,1	4,08	0,03				
		11,3	3,76	0,35	30	67,9	68,0	+ 0,1
		22,0	3,40	0,71				
		37,2	3,12	0,99				
0,0202	1,69	0	[1,88]	—				
		0,8	1,86	0,02				
		11,5	1,62	0,26	22	49,2	49,8	+ 0,6
		26,1	1,36	0,52				
		42,2	1,16	0,72				
0,0140	1,85	0	[1,30]	—				
		0,7	1,28	0,02				
		12,2	1,10	0,20	17	39,9	39,3	— 0,6
		24,8	0,92	0,38				
		42,3	0,66	0,64				
0,0078	2,11	0	[0,73]	—				
		0,4	0,72	0,01				
		13,9	0,58	0,15	12	27,2	27,2	± 0
		27,2	0,43	0,30				
		42,2	0,25	0,48				

In wiederholten Versuchen konnten wir uns jedoch davon überzeugen, daß gleichmäßig bereitete Auszüge aus einer bestimmten Trockenhefe in ihrer Wirksamkeit genügend übereinstimmten. Wegen der wechselnden Kinetik der einzelnen Hydrolysen sind in Tab. 18 die Reaktionskonstanten graphisch für die Zeit $t = 0$ extrapoliert.

Daneben sind die den Tab. 10 bis 17 entnommenen scheinbaren Dissoziationskonstanten der Reaktionszwischenprodukte verzeichnet. Wie die β-Glucosidase des Emulsins, so besitzt auch die Maltase der Hefe zum aliphatischen Glucosid [242] durchschnittlich kleinere Affinität als zum Derivat des Phenols. Allerdings ist die Reihenfolge der Affinitäten bei den einzelnen Maltasen nicht die gleiche.

Tabelle 18.
Reaktions- und Dissoziationskonstanten der untersuchten Maltaselösungen.

Auszug aus	Reaktionskonstante × 10^4 für 1 g Trockenhefe in 50 ccm			Dissoziationskonstante		
	Maltose	Methylglucosid	Phenylglucosid	Maltose	Methylglucosid	Phenylglucosid
Löwenbräuhefe	91	23	632	0,12	0,075	0,050
Hofbräuhefe	50	15,5	536	0,145	0,028	0,021
Kopenhagener Hefe	25	14	—	0,30	0,037	—

Die Quotienten der Reaktionskonstanten $Q_{0,14\,n}$ gehen aus der 2. und 4. Spalte der Tab. 19 hervor. Sie differieren für Methylglucosid zu Maltose wie 1:2,5. Die

auf die Substratkonzentration $[S] = \infty$ reduzierten Quotienten (3. Spalte) sind dagegen weit innerhalb der möglichen Versuchsfehler von ±20% konstant. Durch die große Affinität der Maltase zum α-Phenylglucosid (ϱ in 0,14n-Lösung > $^3/_4$) ist es bedingt, daß trotz der im Verhältnis 1:2,5 schwankenden k_{Ph}-Werte, die Quotienten für Phenylglucosid:Maltose bei übereinstimmendem k_{Ma} nur wie 1:1,5 divergieren. Aber auch diese Divergenz verringert sich bei Berücksichtigung der Verschiedenheit der scheinbaren Dissoziationsreste.

Tabelle 19. Vergleich der beobachteten und reduzierten Enzymwertquotienten.

Enzym aus	Methylgluc. / Maltose		Phenylgluc. / Maltose	
	$Q_{0,14}$	Q_{∞}	$Q_{0,14}$	Q_{∞}
Löwenbräuhefe	0,25	**0,21**	7,0	**5,1**
Hofbräuhefe	0,31	**0,18**	10,7	**6,1**
Kopenhagener Hefe	0,56	**0,23**	—	—

Zeitschrift für physikalische Chemie **109**, S. 65 [1924].

87. VERGLEICH VON $H^{\cdot}$-IONEN- UND FERMENTKATALYSE EINIGER ZUCKERARTEN UND GLUCOSIDE.

Von RICHARD KUHN und HARRY SOBOTKA.

(Mitteilung aus dem Chem. Laboratorium der Bayer. Akad. d. Wissensch. in München.)

(Mit 2 Abbildungen im Text.)

(Eingegangen am 31. 1. 24.)

1. Der wichtige Befund E. ABDERHALDENS und seiner Mitarbeiter[1], daß der zeitliche Verlauf enzymatischer Polypeptidspaltungen nur durch Zusatz der in den natürlichen Eiweißkörpern vorkommenden Aminosäuren in ausgesprochenem Maße verzögert wird, hat vor kurzem ein Gegenstück in der Chemie der Kohlehydrate gefunden. Es wurde beobachtet[2], daß die fermentative Hydrolyse gewisser Zucker und Glucoside nur durch diejenige Form des Traubenzuckers (α- oder β-Glucose), die im Aufbau dieser Stoffe beteiligt ist, gehemmt wird. Es ist hierin eine neue Stütze für die Annahme zu erblicken, daß die enzymatische Hydrolyse der Zuckerderivate ihren Weg über Enzym-Zucker-Verbindungen von bestimmter Konfiguration nimmt. Der verschiedenartige Bau dieser Reaktionszwischenprodukte, der z. B. bei der Spaltung von Disacchariden vorhergesehen, aber in diesem Falle durch Analyse der Reaktionsendprodukte nicht festgestellt werden kann[3], [66] ging auf diese Weise beim Vergleich verschiedener Saccharasen hervor, von denen die der Münchener Löwenbräuhefe den Rohrzucker am Fructose-, jene des Aspergillus oryzae dagegen am Glucoserest bindet.

Die wechselnde Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Konzentration der Zucker und Glucoside hat ferner am Beispiel des Hefeinvertins[1]) und der β-Glucosidase des Emulsins[2]) die bedeutenden Unterschiede der Affinitäten dargetan, die ein bestimmtes Enzym zu nahe verwandten Substraten aufweisen kann.

---

[1] E. ABDERHALDEN und A. GIGON, Zeitschr. f. physiol. Chemie **53**, 251 [1907]; E. ABDERHALDEN und M. GUGGENHEIM, Zeitschr. f. physiol. Chemie **54**, 331 [1908].

[2] R. KUHN, Zeitschr. f. physiol. Chemie **127**, 234 [1923]; **129**, 57 [1923] (*Abh. 82 und 84*).

[3] Bei der Raffinose sind dagegen die verschiedenen Angriffspunkte des Emulsins und Invertins am Auftreten von Galactose + Rohrzucker bzw. Fructose + Melibiose erkennbar.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **125**, 28 [1922/23] (*Abh. 81*).

[2]) R. WILLSTÄTTER, R. KUHN und H. SOBOTKA, Zeitschr. f. physiol. Chemie **129**, 33 [1923] (*Abh. 83*).

2. Die vorliegenden Messungen gestatten nun eine Vertiefung der Problemstellung E. F. ARMSTRONGS[3], dessen Untersuchungen der „sucroclastic action of acids as contrasted with that of enzymes" gegolten haben. Sie führen zu der Frage, in welchem Verhältnis die Hydrolysengeschwindigkeiten bei gleicher Konzentration der Reaktionszwischenprodukte stehen. Es handelt sich jedoch nicht um den Vergleich der Katalysen bei äquimolarer Konzentration der Enzym-Zucker- und der entsprechenden $H^{\cdot}$-Zuckerverbindungen bei gleicher Temperatur. Einen solchen Vergleich, der sich auf die absolute Konzentration des Enzyms stützt, hat H. VON EULER[4] für die Inversion des Rohrzuckers angestellt. Es soll vielmehr geprüft werden, in welchem Verhältnis die Geschwindigkeiten des Umsatzes stehen, wenn einerseits gleiche Mengen der Verbindungen eines bestimmten Enzyms mit verschiedenen Glucosiden, andererseits gleiche Mengen der Verbindungen des $H^{\cdot}$-Ions mit denselben Glucosiden zerfallen.

Unter den von ARMSTRONG eingehaltenen Versuchsbedingungen waren die Konzentrationen der Enzym-Zucker-Verbindungen überaus verschieden. Er ließ nämlich gleiche Fermentmengen auf äquimolare verdünnte Zuckerlösungen wirken. Von besonderen Fällen[5] abgesehen, wird aber nur der Vergleich der für unendlich hohe Substratkonzentration extrapolierten Umsätze, die durch gleiche Enzymmengen in gleichen Zeiten bewirkt werden, über die relative Zerfallsgeschwindigkeit der Reaktionszwischenprodukte Auskunft geben. Erblickt man nämlich mit L. MICHAELIS und M. L. MENTEN[6] in den Aktivitäts-pS-Kurven die Dissoziationsrestkurven der Enzymsubstratverbindungen, [67] dann werden die Konzentrationen der letzteren für $[S] = \infty$ untereinander und mit der Gesamtkonzentration des Enzyms übereinstimmen.

In bezug auf den Mechanismus der nicht enzymatischen $H^{\cdot}$-Ionenkatalyse sei mit H. VON EULER[1]) angenommen, daß die $H^{\cdot}$-Verbindungen glucosidartig gebauter Stoffe spontan zerfallen. Auch mögen sich die Ionengleichgewichte mit außerordentlich großer Geschwindigkeit immer wieder einstellen und die folgenden Betrachtungen auf den Vergleich von Körpern mit möglichst geringem Strukturunterschiede beschränkt bleiben.

Stünden z. B. die k_b-Werte[2]) von α-Methylglucosid und Rohrzucker in demselben Verhältnis wie ihre von L. MICHAELIS[3]) gemessenen Konstanten der Säuredissoziation k_a, so müßte nach den Befunden E. F. ARMSTRONGS die Halbwertszeit für den Zerfall der α-Methylglucosid-$H^{\cdot}$-Verbindung 600mal größer sein als für den Zerfall der entsprechenden Saccharoseverbindung. Die Hydrolysengeschwindigkeiten verhalten sich nämlich wie 0,17 : 1240, während die k_a-Werte $1{,}97 \cdot 10^{-14}$ und $2{,}40 \cdot 10^{-13}$ betragen. In diesem Falle könnte ein wesentlicher Teil des Unterschiedes auf der relativ stärker basischen Natur des Rohrzuckers beruhen.

3 Proc. Roy. Soc. **74**, 188 [1904]; E. F. ARMSTRONG und R. J. CALDWELL, Proc. Roy. Soc. **73**, 526 [1904]; **74**, 195 [1905].

4 Ber. d. d. chem. Ges. **55**, 3583, 3589 [1922].

5 R. KUHN, Zeitschr. f. physiol. Chemie **125**, 1, 24 [1922/23].

6 Biochem. Zeitschr. **49**, 333 [1913].

1) Zeitschr. f. physik. Chemie **32**, 348 [1900]; **36**, 641 [1901].

2) Vgl. L. MICHAELIS, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl., I. Teil, S. 52ff. [1922].

3) Ber. d. d. chem. Ges. **46**, 3683 [1913]; L. MICHAELIS und P. RONA, Biochem. Zeitschr. **47**, 457 [1912].

3. Die gemachten Voraussetzungen sind wohl beim Vergleich von Rohrzucker und Raffinose in ihrem Verhalten gegen Säuren und Invertin am weitestgehenden erfüllt. Stehen die k_h-Werte des Di- und Trisaccharids in demselben Verhältnis wie die experimentell ermittelten Werte von k_a[4], so wird nach den Messungen von H. E. ARMSTRONG und W. H. GLOVER[5] bei gleicher Acidität die Saccharose-H'-Verbindung 1,6mal schneller zerfallen als die entsprechende Raffinoseverbindung. In bemerkenswerter Übereinstimmung damit zerfällt nun auch die Invertin-Rohrzucker-Verbindung 2 ± 1mal so rasch als die Raffinose-Enzym-Verbindung[6].

Die „relative Spezifität" der Hefesaccharase läßt sich somit durch die Dissoziationskonstanten K_S und K_R der Verbindungen, die sie mit [68] Saccharose und Raffinose bildet, genügend genau beschreiben. Das Mengenverhältnis dieser Verbindungen ist für das Verhältnis der enzymatischen Umsatzgeschwindigkeiten beider Zucker ausschlaggebend.

4. Aus den Eigenschaften der Aktivitäts-pH- und der Aktivitäts-pS-Kurven[1]) des Invertins wurde geschlossen, daß die Bindung des Enzyms an den Zucker (K_S) von der Acidität der Lösung nur in geringem Maße abhängt, daß vielmehr die H'-Ionen die Zerfallsgeschwindigkeit des Reaktionszwischenproduktes beeinflussen[2]).

Zu dem gleichen Ergebnis führt die Untersuchung des Systems Emulsin-Salicin (siehe den 1. Abschnitt des experimentellen Teils). Wir finden hier beim Wendepunkt der pH-Kurve ($pH = 6{,}8$) die scheinbare Dissoziationskonstante der Enzym-Glucosid-Verbindung sogar etwas größer als bei optimaler Acidität ($H' = 4 \cdot 10^{-5}$), nämlich 0,047 gegenüber 0,035, während sie bei Giltigkeit der Theorie von L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN[3]) auf etwa den halben Wert sinken müßte.

5. Das Verhältnis der Hydrolysengeschwindigkeiten von Maltose, α-Phenyl- und α-Methyl-Glucosid durch Mineralsäuren ist von A. v. SIGMOND[4]), E. F. ARMSTRONG[5]) und

Tabelle 1.

Substrat	Reaktionskonstante der Säurehydrolyse 74,1° ½ norm. HCl	100° $\frac{1}{10}$ norm. HCl	$\varrho_{Säure}$	ϱ_{Enzym}
α-Phenylglucosid	—	0,0165	25	28
α-Methylglucosid	0,000167	0,00066	0,14	0,20
Maltose	0,00123	—		

[4] Siehe 3. Abschnitt des experimentellen Teils.
[5] Proc. Roy. Soc. [B] **80**, 312 [1908].
[6] Zeitschr. f. physiol. Chemie **125**, 28, 35 [1922/23]. — Um eine Vorstellung von der Größe des nicht auf gleiche Konzentrationen der Reaktionszwischenprodukte bezogenen Geschwindigkeitsverhältnisses zu geben, sei erwähnt, daß man im vorliegenden Falle für weitgehend verdünnte äquimolare Lösungen der Zucker 1 : 16 bis 1 : 48 (statt 1 : 2) finden würde.

[1]) R. KUHN, Die Naturwissenschaften **11**, 732, 734, 740ff. [1923] (*Abh. 7*).
[2]) Wenn bei der H'-Katalyse die Konzentration der Reaktionszwischenprodukte durch die k_h-Werte der Glucoside bestimmt wird, dann könnte man das Wesen der Invertinwirkung in erster Annäherung darin erblicken, daß die basische Natur des Rohrzuckers und seines Galaktosides durch die Vereinigung mit dem Enzym in etwa gleichem Maße verstärkt wird.
[3]) Biochem. Zeitschr. **110**, 217 [1920].
[4]) Zeitschr. f. physik. Chemie **27**, 385 [1898]. [5]) Proc. Roy. Soc. **74**, 188 [1905].

von E. Fischer[6] gemessen worden. Genau dasselbe Verhältnis gilt nun, wie aus Tab. 1 hervorgeht, auch für die Hydrolyse durch Hefeenzym. Voraussetzung ist, daß sich auch in diesem Falle die Reaktionskonstanten auf solche [69] Substratkonzentrationen beziehen, bei denen prozentisch gleiche Beträge der Maltase gebunden und somit katalytisch wirksam sind. Die Zahlen der 5. Spalte sind die Mittelwerte der für Löwenbräu-, Hofbräu- und Kopenhagener Hefe durch Extrapolieren bestimmten Q_{∞}[1]).

Sei es, daß diese auffallende Übereinstimmung zwischen H˙-Ionen- und Fermentkatalyse beim Invertin und bei der Maltase der Hefe zufällig ist, sei es, daß bei den β-Glucosiden die Vereinigung mit dem Emulsin recht ungleiche Änderungen des elektrochemischen Charakters bedingt: die relative Spezifität des Emulsins läßt sich durch das auswählende Bindungsvermögen allein nicht beschreiben. Es steht aber noch nicht fest, wie weit in diesem Falle die meßbaren Reaktionsgeschwindigkeiten als Maß für die Konzentration der Enzym-Glucosid-Verbindungen gelten können, wie weit die Voraussetzungen für die Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes erfüllt sind. Anders als bei Invertin und Maltase ist nämlich die Proportionalität zwischen Emulsinmenge und Geschwindigkeit der β-Hydrolysen auf ein enges Gebiet beschränkt und die scheinbaren Dissoziationskonstanten erweisen sich in starkem Maße abhängig von der Konzentration des Katalysators. Auch ist die wesentliche Verschiedenheit der optimalen Aciditäten ($[H^{\cdot}] = 5 \cdot 10^{-6}$ bis $40 \cdot 10^{-6}$) zu berücksichtigen, bei denen die Hydrolysen der einzelnen β-Glucoside verfolgt wurden. Es ist möglich, daß die eben angeführten Erscheinungen teilweise mit der grob dispersoiden Natur der angewandten Aufschlämmungen unserer Emulsinpräparate zusammenhängen.

Tabelle 2.

Substrat	Reaktionskonstante der Säurehydrolyse			$Q_{Säure}$	Q_{Enzym}
	74°	78°	100°		
Helicin	—	0,00125		1,1	5 ± 2
Salicin	0,0010	0,00111			
β-Phenylglucosid	—	0,00243	0,00556	0,46	8,3 ± 0,5
β-Methylglucosid	0,00030	0,00046	0,00137	5,3 (4,1)	1,0 ± 0,2

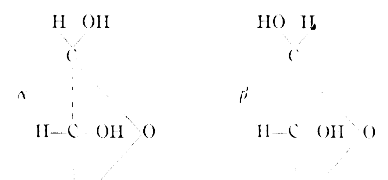
Nach Tab. 2 ist der Quotient aus den Geschwindigkeiten der Säurespaltung beim Vergleich von β-Phenyl- und β-Methylglucosid 5mal größer als bei enzymatischer Katalyse, während er beim Vergleich [70] des Salicins mit dem Phenolglucosid 18mal kleiner ist. Für die Deutung dieser Divergenzen ergeben sich bei Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten der untersuchten β-Glucoside nach der Gaskettenmethode von L. Michaelis[1]] keine Anhaltspunkte. Auf die nach H. v. Euler für die H˙-Ionenkatalyse maßgebenden basischen Dissoziationskonstanten der Substrate gestatten diese Messungen freilich keinen Rückschluß.

[6] Zeitschr. f. physiol. Chemie **107**, 176, 192 [1919].

[1]) Siehe Tab. 19 einer im Druck der Zeitschr. f. physiol. Chemie befindlichen Untersuchung „Über die relative Spezifität der Hefemaltase" (*Abh. 86*).

[1]] Die Wasserstoffionenkonzentration, I. Aufl., Abschn. C, I, S. 119ff., Berlin [1914].

6. Aus den Säuredissoziationskonstanten der Glucoside, die für die α- und β-Verbindung des Phenols erstmalig bestimmt und für die Methylderivate neu gemessen wurden, läßt sich ein Beweis für die räumliche Lage der Hydroxylgruppen in der α- und β-Glucose ableiten. Er führt zu denselben Formeln, die C. TANRET[2], J. BÖESEKEN[3], L. MICHAELIS[4] und A. PICTET[5] auf unabhängigen Wegen ermittelt haben:



Die Phenolglucoside sind, der elektronegativen Natur des Phenylrestes entsprechend, stärker sauer als die Methylglucoside, in denen der Traubenzucker an die schwach positiven Methylgruppen geknüpft ist. Bei Nachbarstellung der am ersten und zweiten C-Atom der α-Glucose haftenden Hydroxylgruppen ist nun zu erwarten, daß der negative Substituent in α-Stellung die Säurenatur mehr verstärkt als in β-Stellung, und daß umgekehrt α-ständiges Methyl ein weniger saures Glucosid ergibt als β-ständiges. Stünden dagegen die Hydroxylgruppen 1 und 2 in der α-Glucose in Transstellung, so wäre das gegenteilige Verhalten zu erwarten. Aus der folgenden Zusammenstellung geht hervor, daß die erste Voraussetzung nicht nur bei den aliphatischen, sondern auch bei den aromatischen Glucosiden zutrifft:

[71]

	$k_a \cdot 10^{14}$
α-Methylglucosid . . .	1,34 (18,5°)
β-Methylglucosid . . .	1,97 (18,5°)
α-Phenylglucosid . . .	20,1 (17,8°)
β-Phenylglucosid . . .	7,6 (18,0°)

Wir machen dabei wie MICHAELIS die Annahme, daß die Substitution vorwiegend den elektrochemischen Charakter der zweiten, benachbarten Hydroxylgruppe beeinflußt. Wir bezweifeln aber nicht, daß für die Bildung von Alkalisalzen überhaupt bei den Zuckerarten auch andere Hydroxyle, insbesondere die in 6-Stellung befindliche primäre OH-Gruppe in Betracht kommt.

Experimenteller Teil.

1. Einfluß der H˙-Ionen auf die Affinität des Emulsins zum Salicin.

Nach der von L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN entwickelten Theorie¹) der Invertasewirkung, derzufolge die Inversionsgeschwindigkeiten bei wechselnder Konzentration der H˙-Ionen den jeweils vorhandenen Dissoziationsresten der Saccharose-

[2] Bull. Soc. Chim. [3] 13, 728, 733 [1895].
[3] Chem. Ber. 46, 2612 [1913].
[4] Chem. Ber. 46, 3683 [1913].
[5] Helv. chim. acta 3, 649 [1920].
¹) A. a. O.; siehe auch Die Naturwissenschaften 11, 732, 740f. [1923] (Abh. 7).

Saccharase-Verbindung entsprechen, ist zu erwarten[2], daß 1. die *pH*-Kurve bei Änderung der Substratkonzentration, 2. die *pS*-Kurve bei Änderung der H'-Ionenkonzentration eine Verschiebung erleidet.

Die experimentellen Beobachtungen stehen weder mit der ersten[3], noch mit der zweiten[4] dieser Folgerungen im Einklang. Es zeigt sich nun, daß auch beim Emulsin die zu erwartende Verschiebung der *pS*-Kurve nicht eintritt.

Über die Spaltung des Salicins bei wechselnder Acidität liegen bereits Messungen von E. VULQUIN[5] und von R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER[6] vor. Der Parameter der *pH*-Kurve ergibt sich aus Tab. 3, zu der ein rohes Emulsinpräparat von MERCK diente, zu $1{,}8 \cdot 10^{-7}$. Die Gestalt der Kurve ist, wie aus dem Vergleich der beiden letzten Spalten der Tab. 3 hervorgeht, angenähert die einer Dissoziationskurve (Abb. 1).

[72]

Tabelle 3.
Salicinhydrolyse und H'-Ionenkonzentration.
25 ccm 0·0775 norm. Salicinlösung + 10 ccm $^1/_5$ norm. Phosphat- bzw. Acetatgemisch + 10 mg Ferment zu 50 ccm; 30°.

H' (*pH*)	Zeit (Min.)	*D* (l = 4 dm)	Drehungszunahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^5$ $\frac{10^5}{t} \log_{10} \frac{a}{a-x}$	$\frac{k}{k_{max}}$	$\frac{H^{\cdot}}{H^{\cdot} + 1{,}8 \cdot 10^{-7}}$
	0	— 2,85		—	—		
$4 \cdot 10^{-5}$	60	— 1,57	1,28	29 $^1/_2$	255	100	100
(4,4)	180	0,065	2,785	64 $^1/_2$	251		
	∞	— 1,45	4,30	100	—		
$1 \cdot 10^{-6}$	60	1,67	1,18	27 $^1/_2$	232	91	85
(6,0)	180	— 0,19	2,66	61 $^1/_2$	232		
$3 \cdot 10^{-7}$	60	— 1,98	0,87	20	163	69	64
(6,5)	180	— 0,96	1,89	44	139		
$1 \cdot 10^{-7}$	60	2,435	0,415	9 $^1/_2$	72	30	36
(7,0)	180	— 1,825	1,025	23 $^1/_2$	65		
$2 \cdot 10^{-8}$	69	— 2,72	0,13	3	22	9	10
(7,7)	180	— 2,50	0,35	8	20		

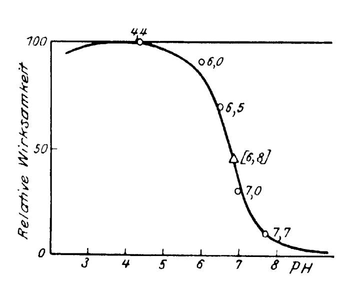


Abb. 1. Aktivitäts-*pH*-Kurve des Emulsins (Salicinspaltung).

[2] Zeitschr. f. physiol. Chemie **125**, 28 [1922/23].
[3] L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN, a. a. O.
[4] Zeitschr. f. physiol. Chemie **125**, 44 [1922/23].
[5] Soc. biol. **70**, 270, 763 [1911].
[6] Zeitschr. f. physiol. Chemie **121**, 183, 188 [1922].

Bei optimaler Acidität ist die Hälfte der in bezug auf die Substratkonzentration maximal möglichen Reaktionsgeschwindigkeit in 0,035 ± 0,005 norm. Lösung erreicht (Tab. 4).

Tabelle 4.

[73] Wechselnde Salicinkonzentrationen bei optimaler Acidität.

$pH = 4{,}4$; $K_{\mathrm{Sal.}} = 0{,}035$. 10 mg Emulsin in 20 ccm; 30°.

pS (Konz. d. Sal.)	Zeit (Min.)	$[\alpha]_D$ $l = 4$ dm (°)	Drehungs-zunahme (°)	$k \cdot 10^6$	$k \cdot 10^6 \cdot$ [Sal.]	Dissoziationsrest $\varrho \cdot 100$ ber.	Dissoziationsrest $\varrho \cdot 100$ gef.	$100 \cdot \Delta\varrho$
1,31 (0,049 n.)	50	— 2,24	1,375	246	120,5	58,3	58,4	+ 0,1
	100	— 1,28	2,335					
	170	0,385	3,23					
	367	+ 0,895	4,52					
1,49 (0,0324 n.)	50½	— 1,345	1,055	304	98,5	48,1	47,8	— 0,3
	100	— 0,545	1,855					
	170	+ 0,16	2,56					
	368	+ 0,895	3,295					
1,67 (0,0216 n.)	84½	— 0,385	1,22	360	77,8	38,2	37,6	— 0,6
	184½	+ 0,285	1,89					
	387½	+ 0,615	2,22					
1,87 (0,0135 n.)	81	— 0,175	0,835	435	58,7	27,8	28,4	+ 0,6
	185	+ 0,21	1,22					
	389	+ 0,33	1,34					
2,02 (0,0095 n.)	80½	— 0,09	0,615	465	44,2	21,3	21,4	+ 0,1
	186	+ 0,11	0,815					
	390	+ 0,22	0,925					

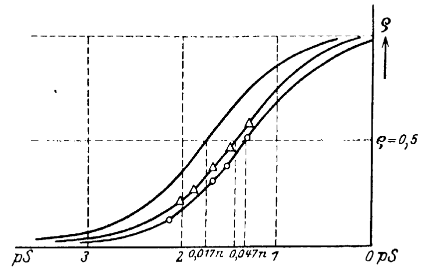


Abb. 2. Aktivitäts-pS-Kurven des Emulsins (Salicinspaltung).

Δ—Δ Dissoziationsrestkurve bei $pH = 4{,}4$.

o—o Dissoziationsrestkurve für $pH = 6{,}8$ (beob.).

- - - - Dissoziationsrestkurve für $pH = 6{,}8$ (ber. nach L. MICHAELIS und M. ROTHSTEIN).

Bei $pH = 6{,}8$ sollte dies nach MICHAELIS und ROTHSTEIN in 0,017 norm. Lösung der Fall sein. Aus Tab. 5 berechnet sich jedoch der fast dreimal so große Wert 0,047 (Abb. 2).

[74]

Tabelle 5.
Salicinmenge und Reaktionsgeschwindigkeit bei $pH = 6,8$.
$K_{Sal.} = 0,047$. 20 mg Emulsin in 20 ccm; 30°.

pS (Konz. d. Sal.)	Zeit (Min.)	$[\alpha]_D$ $l = 4$ dm (°)	Drehungszunahme (°)	$k \cdot 10^5$	$k \cdot 10^6 \cdot$ [Sal.]	Dissoziationsrest $\varrho \cdot 100$ ber.	gef.	$100 \cdot \Delta\varrho$
1,31	20	−3,105	0,51					
(0,0495 n.)	45	−2,59	1,025	192	95,5	51,2	51,2	± 0
	90	−2,015	1,60					
1,54	20	−1,79	0,355					
(0,0291 n.)	45	−1,41	0,735	239	69,5	38,2	37,7	−0,5
	91	−0,96	1,185					
1,66	30	−1,22	0,40					
(0,022 n.)	60	−0,835	0,785	271	59,5	31,8	31,8	± 0
	110	−0,395	1,225					
2,14	30	−0,36	0,17					
(0,0072 n.)	60	−0,21	0,32	344	25,0	13,3	13,3	± 0
	110	−0,09	0,44					

2. Säurehydrolyse der β-Glucoside.

Je zwei bei 20° zur Marke aufgefüllte 10 ccm-Kölbchen, in denen die Hydrolyse durch ½ norm. HCl vor sich ging, tauchten wir in ein Glycerinbad, das durch siedendes Benzol auf 77 ± 1° gehalten wurde. Nach Verlauf der in Tab. 6 angegebenen Zeiten kühlten wir die Reaktionsgefäße mit fließendem Wasser auf Zimmertemperatur ab

Tabelle 6.

Substrat	Zeit (Min.)	α_D $l = 2$ dm (°)	Drehungszunahme (°)	Spaltung (%)	$k \cdot 10^5$	$k \cdot 10^5$ Mittel
Helicin	20	−1,89	0,19	6	135	125
0,0578 norm. .	80	−1,48	0,60	19	114	
Salicin	80	−1,50	0,56	17	108	111
0,0562 norm. .	125	−1,19	0,87	27½	114	
β-Phenylglucosid .	90	−0,85	1,34	41	249	243
0,0595 norm. .	225	0,15	2,34	71	237	
β-Methylglucosid .	180	−0,31	0,23	17½	46	46
0,0412 norm. .	420	−0,07	0,47	35½	47	

[76] und ergänzten neuerlich zur Marke. Gleich darauf wurde die Drehungszunahme in einem 6 ccm fassenden 2 dm-Rohre bestimmt. Alkalisierung der Lösungen erübrigte sich, da das optische Gleichgewicht der Glucose erreicht und in Kontrollversuchen bei der Polarisationstemperatur innerhalb 10 bis 20 Minuten keine Säurewirkung zu beobachten war.

Tabelle 7.

	[NaOH]	[Zucker] bzw. [Glucosid]	EMK Millivolt	pH	pOH	[H']·10⁻¹³	[OH']	[OH']	k_a 10⁻¹⁴ für γ = 1	k_a 10⁻¹⁴ für γ = 0,5	Mittel von k_a 10⁻¹⁴
Natronlauge (18°)	0,04		985	12,71	1,41	1,95	0,0388	—	—	—	
(18°)	0,02	—	967	12,40	1,72	3,98	0,0108		—	—	
(17,8°)	0,0165		962	12,34	1,80	4,57	0,0158		—	—	
(18,5°)	0,01		950	12,10	2,02	7,95	0,00954		—	—	
(17,8°)	0,008	—	943	12,01	2,13	9,77	0,00741	—	—	—	
Maltose (19,5°)	0,04	0,1	938	11,88	2,20	13,2	0,0063	0,0325	63,6	123	
	0,04	0,2	912	11,42	2,66	38,0	0,0022	0,0366	85,2	110	
	0,02	0,1	910,5	11,41	2,67	38,9	0,00215	0,0169	79,2	99,3	96
	0,02	0,2	887,5	11,00	3,08	100,0	0,00083	0,0182	100	111	
Saccharose (18,5°)	0,02	0,1	941	11,95	2,17	11,2	0,00675	0,01225	15,6	18,2	
	0,02	0,4	909	11,40	2,72	39,8	0,00190	0,0171	17,8	18,6	
	0,01	0,1	922	11,61	2,51	24,5	0,00309	0,00645	16,9	18,1	17.7
	0,01	0,4	891	11,09	3,03	81,2	0,00092	0,00862	17,9	18,3	
Raffinose (18,3°)	0,02	0,05	950,5	12,11	2,01	7,57	0,0098	0,0092	17,5	22,6	
	0,02	0,2	921	11,60	2,52	25,1	0,00302	0,0160	21,8	23,9	
	0,02	0,2(18°)	917	11,56	2,57	27,5	0,00269	0,0163	23,8	26,1	
	0,01	0,05	931	11,78	2,34	16,6	0,00456	0,00498	18,4	20,6	21.6
	0,01	0,2	902	11,28	2,84	53,6	0,00144	0,00810	22,6	23,6	
α-Methylglucosid (18,7°)	0,04	0,25	977	12,56	1,54	2,75	0,0288	0,0100	1,15	1,20	
	0,04	0,5	969	12,43	1,68	3,71	0,0209	0,0179	1,38	1,43	
	0,02	0,25	959	12,25	1,85	5,62	0,0141	0,0049	1,12	1,15	1.34
	0,02	0,5	948,5	12,08	2,03	8,31	0,0093	0,0097	1,64	1,68	
β-Methylglucosid (18,5°)	0,04	0,2	976	12,56	1,56	2,75	0,0275	0,0113	1,65	1,76	
	0,04	0,5	964	12,35	1,77	4,46	0,0170	0,0218	2,03	2,13	
	0,02	0,2	957	12,23	1,89	5,88	0,0129	0,0061	1,85	1,91	1.97
	0,02	0,5	945	12,02	2,10	9,54	0,0079	0,0111	2,17	2,23	
α-Phenylglucosid (17,8°)	0,0165	0,1	936	11,89	2,25	12,9	0,0056	0,0102	14,5	16,4	20.1
	0,008	0,1	908	11,40	2,74	39,8	0,00182	0,00559	23,5	25,0	
β-Phenylglucosid (18°)	0,02	0,05	958,5	12,25	1,88	5,62	0,0132	0,0058	7,37	8,48	7.56
	0,01	0,05	940	11,95	2,18	11,2	0,00660	0,00294	6,96	7,41	
Salicin (18°)	0,02	0,05	958,5	12,27	1,86	5,37	0,0138	0,0052	6,27	7,01	
	0,02	0,1	952	12,16	1,97	6,92	0,0107	0,0083	6,26	6,88	
	0,01	0,05	938,5	11,93	2,20	11,75	0,00631	0,0032	8,20	8,80	7.51
	0,01	0,1	931	11,80	2,33	15,85	0,00467	0,0049	8,14	8,54	

3. Säuredissoziationskonstanten.

In der Tab. 7 (S. 75) sind für jene Zucker und Glucoside, deren Affinitäten zu den Enzymen der Hefe und zum Emulsin durch die Arbeiten aus diesem Laboratorium bekannt wurden, die Säuredissoziationskonstanten k_a angegeben. Die Werte für Saccharose, Maltose und die beiden Methylglucoside sind durchwegs niedriger als die von L. MICHAELIS und P. RONA[1]) mit genau gleicher Versuchsdauer erhaltenen:

[1] Siehe L. MICHAELIS und P. RONA a. a. O., und zwar S. 235 u. 241 f.

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 46, 3683 [1913]; Biochem. Zeitschr. 49, 232 [1913].

Saccharose:	$17,7 \cdot 10^{-14}$	(18,5°)	MICHAELIS und RONA:	$24 \cdot 10^{-14}$
Maltose:	$96 \cdot 10^{-14}$	(19,5°)	,, ,, ,,	$180 \cdot 10^{-14}$
α-Methylglucosid:	$1,34 \cdot 10^{-14}$	(18,7°)	MICHAELIS:	$1,97 \cdot 10^{-14}$
β-Methylglucosid:	$19,7 \cdot 10^{-14}$	(18,5°)	,,	$2,64 \cdot 10^{-14}$

Stärker sauer fanden wir nur die Raffinose:

$k_a = 21,6 \cdot 10^{-14}$ (18,3°) MICHAELIS und RONA: $18 \cdot 10^{-14}$.

Alle angewandten Präparate waren mehrmals aus Alkohol bzw. Wasser umkrystallisiert und durch Bestimmung des Drehungsvermögens und des Schmelzpunktes auf Reinheit geprüft worden.

Die neu ermittelte Dissoziationskonstante des Salicins stimmt mit der des β-Phenylglucosids überein; der Eintritt der CH_2OH-Gruppe in den Benzolkern verursacht also keine meßbare Änderung des elektrochemischen Verhaltens.

